

Technische Universität Dresden
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Institut für Zoologie
Lehrstuhl für Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie

Vergleichende molekulare und physiologische Untersuchung von Östradiol, drei Flavanonen und eines Heilpflanzenextrakts auf Östrogen-regulierte Endpunkte in Uterus und Gefäßsystem

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktor rerum naturalium
an der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von
Dipl. Biol. Georg Kretzschmar
aus Dresden

Dresden, 9. Oktober 2006

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. Günter Vollmer
Dr. med. vet. Oliver Zierau
(Technische Universität Dresden)

Gutachter: Prof. Dr. Günter Vollmer
Prof. Dr. Herwig Gutzeit
(Technische Universität Dresden)
PD Dr. rer. nat. habil. Patrick Diel
(Deutsche Sporthochschule Köln)

für Eva und Luise

Versicherung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dresden, 12. Oktober 2006

(Georg Kretzschmar)

Danksagungen

Folgenden Personen gilt mein besonderer Dank:

- Prof. Dr. Günter Vollmer als hervorragendem Doktorvater und für seinen Einsatz zur Finanzierung des Projekts.
- Dr. Oliver Zierau, der mich als Betreuer immer kompetent beraten und mir in schwierigen Situationen Mut gemacht hat.
- Dres. Nisslein und Freudenstein von Schaper & Brümmer für die gute Zusammenarbeit, insbesondere die Durchführung des Tierversuchs und die finanzielle Unterstützung des Projektes.
- Renate Geiss und Germain Ketcha Wanda für die anregenden Diskussionen und die Hilfe bei technischen Schwierigkeiten.
- Susanne Kolba und Antje Bayer für die umfangreiche Unterstützung bei der täglichen Arbeit im Labor.
- meiner Frau Eva und meiner Tochter Luise, die meine schlaflosen Nächte ertrugen und mich immer wieder aufgebaut und unterstützt haben.
- Anja Papke, die als Praktikantin einen Teil der Genexpressionsanalysen Ah-Rezeptor-regulierter Gene durchgeführt hat.
- Allen weiteren Mitglieder der Arbeitsgruppe Vollmer für die gute Zusammenarbeit und die hervorragende Arbeitsatmosphäre.
- Den Mitarbeitern des Kreissaales des Diakonissenkrankenhauses in Dresden, die die für diese Arbeit benötigten Nabelschnüre gesammelt und zur Verfügung gestellt haben.

Zusammenfassung

Eine ständig steigende Nachfrage nach einer auf pflanzlichen Stoffen basierenden Hormonersatztherapie für menopausale Beschwerden, macht eine verstärkte Untersuchung sogenannter Phytoöstrogene erforderlich. Bei den hier untersuchten Substanzen handelt es sich um die chemisch synthetisierten Flavanone 6-(1,1-Dimethylallyl)Naringenin (6DMAN) und 8-Prenylnaringenin (8PN), die ursprünglich in Pflanzen identifiziert wurden. 7-Oxy-prenylnaringenin-4'-Azetat (7OPN) ist ein weiteres Mitglied dieser Stoffgruppe, zu dem jedoch bisher noch praktisch keine Daten vorlagen. Ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen wurde ein isopropanolischer Extrakt aus dem Rhizom von *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. (iCR), der schon seit langer Zeit erfolgreich zur Bekämpfung menopausaler Beschwerden eingesetzt wird, dessen Wirkmechanismus jedoch unbekannt ist und zu dem bisher noch wenige molekulare Daten bezüglich der Wirkung auf einzelne Zielorgane, insbesondere nach einer Behandlung über einen längeren Zeitraum vorliegen.

Die durchgeführten Untersuchungen betrafen zum Einen den Uterus als eines der Hauptzielorgane weiblicher Sexualhormone und zum Anderen die Vena cava, repräsentativ für das Gefäßsystem. Als Modellorganismus wurden Ratten gewählt. Dabei wurde die Genexpression Östrogen (E2)-regulierter Gene auf mRNA-Ebene mittels Real-Time-PCR bestimmt. Die Wirkung von 7OPN wurde in einem *in vitro*-System (MVLN-Zellen) und im Uterus getestet. Zusätzlich wurden humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen als *in vitro*-Modell für das Gefäßsystem eingesetzt. Mit ihnen wurde die Wirkung der Testsubstanzen auf Angiogenese und Differenzierung getestet.

Die durch die E2 hervorgerufenen Effekte entsprachen weitestgehend den Erwartungen. Es konnte sowohl eine Zunahme des Uterusgewichts der Ratten als auch eine Regulation der Expression von Proliferationsmarkern und E2-abhängig regulierten Genen im Uterus auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Auch im Gefäßsystem konnte sowohl eine Regulation E2-abhängig exprimierter Gene beobachtet werden, als auch ein proliferationsfördernde und differentiationsfördernde Wirkung auf venöse Endothelzellen *in vitro*.

Die untersuchten Flavanone zeigten einen von den vorhandenen funktionalen Gruppen abhängigen Effekt auf die E2-regulierten Prozesse und Gene. Während es sich bei 8PN um eine rein östrogen wirkende Substanz zu handeln scheint, wirkt 6DMAN offenbar als selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (SERM) und zeigt für einen Einsatz in der HRT sehr interessante Eigenschaften, da weder ein uterotrophe Wirkung *in vivo*, noch eine angiogene Wirkung *in vitro* beobachtet werden konnte, während gleichzeitig eine östrogene, potentiell kardioprotektive Wirkung auf die Genexpression im Gefäßsystem gezeigt werden konnte.

Auch 7OPN zeigt ein differenziertes Wirkmuster. Ein *in vitro*-Reportergentest in einer stabil transfizierten Brustkrebszelllinie deutete auf eine in Abhängigkeit von der Konzentration E2-antagonistische oder agonistische Wirkung hin. Die Genexpressionsstudien im Uterus der Versuchstiere nach dreitägiger Behandlung zeigten, daß die Wirkung von 7OPN jedoch auch abhängig vom untersuchten Gen ist. Da auch dieses Flavanon keine uterotrophe Wirkung zu besitzen scheint, ist 7OPN ebenfalls eine interessante Zielsubstanz weiterer Untersuchungen im Hinblick auf die Anwendung in der HRT.

Für den in einem Arzneimittel enthaltenen Extrakt iCR konnte in einem 17-tägigen Tierversuch keine östrogene Wirkung auf Uterus und Gefäßsystem gezeigt werden. Während eine Anwendung dieses Extrakts zur Behandlung menopausaler Beschwerden im Lichte dieser Ergebnisse und langjähriger praktischer Erfahrungen zwar sicher erscheint, bleibt der Wirkmechanismus von iCR weiterhin unbekannt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielstellung	2
1.2	Das Hormonsystem	2
1.3	Steroide und Steroidhormone	2
1.4	Endogene Östrogene	3
1.5	Wirkungsweise der Östrogene	4
1.5.1	Östrogenrezeptoren	4
1.5.2	Ligandenbindung an den Östrogenrezeptor	7
1.5.3	Koregulatoren	7
1.5.4	Wirkmechanismen	8
1.6	Wirkung von Östradiol auf den Uterus	10
1.6.1	Der Uterotrophe Test in adulten ovariectomierten Ratten	11
1.7	Das Gefäßsystem	11
1.8	Wirkung von Östradiol auf das Gefäßsystem	13
1.9	Exogene Liganden der Östrogenrezeptoren	15
1.9.1	Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren	15
1.9.2	Das Antiöstrogen Fulvestrant	16
1.9.3	Phytoöstrogene	17
1.10	Überblick über die durchgeführten Versuche	18
1.11	Überblick über die untersuchten Substanzen	19
1.11.1	isopropanolischer Extrakt aus dem Rhizom von <i>Cimicifuga racemosa</i>	19
1.11.2	Naringenine	21
	6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin	23
	8-Prenylnaringenin	23
	7-Prenyloxynaringenin-4'-Azetat	24
1.12	Überblick über die auf ihre mRNA-Expression untersuchten Gene	24
1.12.1	Östrogenrezeptoren	25
1.12.2	Komplement C3	25
1.12.3	Clusterin	26
1.12.4	Progesteronrezeptor	26
1.12.5	Cyclooxygenase 2	27
1.12.6	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase	28
1.12.7	VEGF und VEGFR2	29
1.12.8	Angiotensin I-Converting Enzyme	30
1.12.9	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	30
1.12.10	KI-67	30
1.12.11	Cytochrom P450 7A1	31
1.12.12	Apolipoprotein A1	31

1.12.13 Aryl-Hydrocarbonrezeptor	31
1.12.14 Cytochrom P450 1A1	32
1.12.15 Cytochrom P450 1B1	32
1.12.16 Glutathion-S-Transferase A2 (GSTA2)	33
1.12.17 NAD(P)H-Menadion-Oxidoreduktase 1 (NMOR1)	33
2 Materialien und Methoden	35
2.1 Materialien und Zelllinien	35
2.2 MVLN-Test	36
2.3 Gewinnung und Kultivierung von HUVECs	37
2.4 Proliferationstests	37
2.5 Differenzierungstest	39
2.6 Tierversuche	39
2.6.1 Dreitägiger Versuch mit Wistar-Ratten (Tierversuch 1)	39
2.6.2 17-tägiger Versuch mit DA/Han-Ratten (Tierversuch 2)	40
2.7 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese	40
2.7.1 RNA-Extraktion	40
2.7.2 Konzentrationsbestimmung der gelösten Gesamt-RNA und Überprüfung der RNA-Qualität	41
2.7.3 DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen	41
2.7.4 cDNA-Synthese	41
2.8 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion	42
2.8.1 Primer-Design	42
2.8.2 PCR-Optimierung	43
2.8.3 Bestimmung der PCR-Effizienz	43
2.8.4 Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR	45
2.8.5 Auswertung der Real-Time-PCR	46
2.8.6 Ermittlung der Schmelzkurve der PCR-Produkte	47
2.9 Statistische Auswertung	49
3 Ergebnisse	51
3.1 <i>in vitro</i> -Tests mit 7OPN	51
3.2 Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs)	51
3.2.1 Proliferationstests	51
3.2.2 Differenzierungstests	54
3.3 Tierversuch 1 über drei Tage in Wistar-Ratten	56
3.3.1 Uterotropher Test	56
3.3.2 Genexpression im Uterus	58
Uterine Genexpression nach Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN	58
Uterine Genexpression nach 72-stündiger Behandlung mit 7OPN	63
Uterine Expression Arylhydrocarbonrezeptor-regulierter Gene . . .	65
3.3.3 Genexpression in der Vena cava	67
3.4 Tierversuch 2 über 17 Tage in DA/Han-Ratten	71
3.4.1 Uterotropher Test	71
3.4.2 Genexpression im Uterus	71
3.4.3 Genexpression in der Vena cava	74

3.4.4	Genexpression in der Aorta	77
3.4.5	Genexpression in der Leber	81
4	Diskussion	85
4.1	Diskussion der Methoden	85
4.1.1	HUVEC-Zellkultur	85
4.1.2	Proliferationstest	86
4.1.3	Differenzierungstest	87
4.1.4	Tierversuche	87
4.2	Diskussion der Ergebnisse	88
4.2.1	17 β -Östradiol	88
	Wirkung von E2 auf den Uterus	88
	Wirkung von E2 auf das AhR-System im Uterus	90
	Wirkung von E2 auf das Gefäßsystem	91
4.2.2	8PN	93
	Wirkung von 8PN auf den Uterus	93
	Wirkung von 8PN auf das AhR-Sytem im Uterus	94
	Wirkung von 8PN auf das Gefäßsystem	94
4.2.3	6DMAN	95
	Wirkung von 6DMAN auf den Uterus	95
	Wirkung von 6DMAN auf das AhR-System	96
	Wirkung von 6DMAN auf das Gefäßsystem	96
4.2.4	7OPN	97
	Wirkung von 7OPN <i>in vitro</i>	97
	Wirkung von 7OPN auf den Uterus	97
4.2.5	iCR	98
	Wirkung von iCR auf den Uterus	98
	Wirkung von iCR auf das Gefäßsystem	99
4.2.6	Schlußfolgerungen und Ausblick	100
	Literaturverzeichnis	120

Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
1A	Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase
6DMAN	6-(1,1-Dimethylallyl)Naringenin
7OPN	7-Oxyprenylnaringenin-4'-Azetat
8PN	8-Prenylnaringenin
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym (angiotensin converting enzyme)
AF-1	Aktivator-Funktion 1
AF-2	Aktivator-Funktion 2
AhR, Ah-Rezeptor	Arylhydrocarbonrezeptor
ApoA1	Apolipoprotein A1
ApoJ	Apolipoprotein J
BCA	Bicinchoninische Säure (bicinchoninic acid)
BSA	bovines Serumalbumin
C3	Komplement Component 3
Clu	Clusterin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX2	Cyclooxygenase 2
CYP	Cytochrom P450
cDNA	copy-DNA
DCC	doppelt Aktivkohle-behandeltes FKS
DDT	1,1,1-Trichloro-2,2-Di(4-Chlorophenyl)Ethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRE	Dioxin-responsives Element
E2	17 β -Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylene-diamine-tetraacetic acid)
EDRF	endothelialer Relaxationsfaktor (endothelium derived relaxing factor)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ERE	östrogenresponsives Element
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon

GST	Glutathion-S-Transferase
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC	Histon-Deacetylase-Aktivität
HERS	Heart Estrogen-Progestin Replacement Study
hPRA	humane Progesteronrezeptor-Isoform A
hPRB	humane Progesteronrezeptor-Isoform B
HUVEC	humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells)
HBSS	Hank's balanced salt solution
HRT	Hormonersatztherapie (hormone replacement therapy)
HSP	Hitzeschockprotein
iCR	isopropanolischer <i>Cimicifuga racemosa</i> -Extrakt
KI67	Proliferations-spezifisches Ki-67 Antigen
LDL	low density lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
MMLV-RT	Moloney muriner Leukemie-Virus reverse Transkriptase
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NF κ B	nukleärer Faktor κ B
NMOR	NAD(P)H:Menadion-Oxidoreduktase
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PBS	Phosphatpuffer-Saline (phosphate buffer saline)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PR	Progesteron-Rezeptor
PRE	progesteronresponsives Element
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
SERM	Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
SGP-2	sulphated glycoprotein 2
sHSP	kleine Hitzeschock-Proteine (small heat shock proteins)
SRC-1	Steroidrezeptor-Koaktivator 1 (steroid receptor coactivator 1)
TCCD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
TRPM 2	testosterone repressed protein message 2
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)
VEGFR2	VEGF-Rezeptor 2
WHI	Women's Health Initiative

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die Haupttodesursache bei Männern und Frauen in Europa und Nordamerika dar (1). Allerdings haben prämenopausale Frauen ein weit geringeres Risiko, am kardiovaskulären Syndrom zu erkranken, als gleichalte Männer. Mit der Menopause steigt ihr Risiko jedoch stark an, sodaß im höheren Lebensalter kein Unterschied bei der Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen zwischen Frauen und Männern feststellbar ist (2).

Die sogenannte Hormonersatztherapie, bei der bevorzugt eine Kombination von Östrogenen und Gestagenen verabreicht wird, galt lange Zeit auch als ein effektives Mittel, das erhöhte Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nach der Menopause ungefähr halbieren oder gar vollständig auf das Niveau vor der Menopause senken zu können (1, 3–8). Großangelegte klinische Studien neueren Datums konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen (9, 10). Es liegen sogar Indizien vor, daß bei gesunden Frauen diese Form der HRT zu einer erhöhten Rate von Brustkrebs, koronarer Herzkrankheit, Schlaganfällen und Lungenembolien führt (11).

Alternative Behandlungsmethoden, beispielsweise mit Hilfe von Phytoöstrogenen geraten dadurch bei den betroffenen Frauen verstärkt ins Blickfeld. Verschiedene Extrakte des Rhizoms von *Cimicifuga* (oder *Actaea*) *racemosa* (L.) Nutt., der nordamerikanischen Traubensilberkerze, werden schon seit vielen Jahren als Alternative zur klassischen HRT eingesetzt. Erstaunlicher Weise sind das Wirkprinzip sowie die wirksamen Bestandteile bis heute weitgehend unbekannt. Auch zur Wirkung auf das Gefäßsystem gibt es bislang kaum Daten.

Hopfenbäder wurden schon vor langer Zeit zur Behandlung von gynäkologischen Beschwerden eingesetzt und während der manuellen Hopfenernte soll es zu Störungen des Menstruationszyklus bei den Hopfenpflückerinnen gekommen sein. 1999 konnte der östrogen wirksame Bestandteil des Hopfens als 8-Prenylnaringenin identifiziert werden (12, 13). Es zeigte sich, daß es sich dabei um das stärkste bisher bekannte Phytoöstrogen handelt. Inzwischen wurden noch weitere Naringenine identifiziert, die eine Wirkung auf das östrogene System besitzen. Diese können inzwischen auch chemisch synthetisiert werden, was auch die Herstellung weiterer nicht biogener Naringenine und umfangreiche Untersuchungen dieser Substanzen erlaubt (14, 15).

Einen weiteren Schwerpunkt bei der Entwicklung neuer Formen der Hormonersatztherapie stellen die sogenannten Selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) dar. Ihre Wirkung ist in Abhängigkeit vom Zielorgan entweder östrogen oder auch antiöstrogen. Dadurch können unerwünschte Nebenwirkungen, beispielsweise die Stimulierung des Wachstums des Endometriums oder auch ein erhöhtes Brustkrebsrisiko verhindert werden. Bislang wenig untersucht ist die Frage, ob auch die oben erwähnten Phytoöstrogene SERM-Eigenschaften besitzen.

Aufbauend auf diesen Kenntnissen ergab sich für meine Arbeit folgende Zielstellung:

1.1 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war die Überprüfung der Flavonoide 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin (6DMAN), 8-Prenylnaringenin (8PN) und 7-Oxyprenylnaringenin-4'-Azetat (7OPN) sowie eines isopropanolischen Extraktes aus dem Rhizom von *Cimicifuga racemosa* (iCR) auf mögliche östrogene Effekte im Vergleich zu dem natürlichen Liganden 17 β -Östradiol (E2), insbesondere auf die Expression östrogenabhängig regulierter Gene im Gefäßsystem von Ratten. Durch den Vergleich mit der Wirkung oben genannter Verbindungen auf die Expression östrogenregulierter Gene im Uterus sowie auf die Uterotrophie sollte weiterhin festgestellt werden, ob die Substanzen als Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) wirken.

Diesem Zweck diene auch die Etablierung eines Zellkultursystems, mit dessen Hilfe die Wirkung östrogenen Substanzen auf das Gefäßsystem *in vitro* untersucht werden sollte. Dabei sollten als weitere Endpunkte neben der Genexpression auch Proliferation und Differenzierung der Zellen untersucht werden.

Darauf aufbauend war die Wirksamkeit und Sicherheit bei einem möglichen Einsatz der Testsubstanzen als Therapeutika bei perimenopausalen Beschwerden zu diskutieren.

1.2 Das Hormonsystem

Zusammen mit den Nerven- und Immunsystem stellt das endokrine System den Hauptmechanismus zur Regulation und Kontrolle wichtiger Körperfunktionen dar. Die Informationsträger dieses Systems sind Hormone, welche in sehr geringen Mengen von spezialisierten Drüsen produziert und durch das Blut zu den Zielorganen transportiert werden. Der Transport erfolgt dabei entweder im ungebundenen Zustand oder gebunden an ein Trägerprotein. Sie binden dann im Zielorgan an spezialisierte Hormonrezeptoren an der Zelloberfläche (membranständige Rezeptoren) oder in der Zelle (nukleäre Rezeptoren) nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex reguliert verschiedene Zell- oder Organfunktionen. Hormone beeinflussen Regulations-, Wachstums-, Entwicklungs-, und Homeostasemechanismen wie z.B. Reproduktion, Aufrechterhaltung von Glucose- und Ionenkonzentration im Blut, Blutdruck, Metabolismus und eine Reihe weiterer Funktionen.

Die Balance der Hormonkonzentrationen im Organismus ist essentiell zur Gewährleistung der normalen Körperfunktionen. Es gibt daher eine Reihe von Rückkopplungsmechanismen, die es dem Körper ermöglichen, flexibel auf interne oder externe Änderungen des Hormonstatus zu reagieren (16).

1.3 Steroide und Steroidhormone

Steroide sind Lipide, welche mit Ausnahme der D-Vitamine alle einen Cyclopentanophenanthren-Ring besitzen. Die Biosynthese aller tierischen Steroide erfolgt aus einem gemeinsamen Vorläufer, dem Cholesterin. Zu ihnen gehören neben den Steroidhormonen noch die Sterine (z.B. Cholesterin), die Gallensäuren (z.B. Cholsäure), die Herzglycoside, die Sapogenine und die Steroidalkaloide.

Tabelle 1.1: Steroidklassen und ihre Rezeptoren

KLASSE	ANZAHL C- ATOME	REZEPTOR	NATÜRLICHE VERTRETER
Progestagene	21	Progesteron-Rezeptor	Progesteron
Glucocorticoide	21	Glucocorticoid-Rezeptor	Cortisol
Mineralocorticoide	21	Mineralocorticoid-Rezeptor	Aldosteron
Androgene	19	Androgen-Rezeptor	Testosteron, Dehydroepiandrosteron, Androstendion, Androstendiol, Androsteron, Dihydrotestosteron
Östrogene	18	Östrogenrezeptoren	Östradiol, Östriol, Östron

Die Steroidhormone lassen sich nach der Anzahl ihrer Kohlenstoffatome-Atome und den Rezeptoren an welche sie binden fünf Hauptklassen zuordnen. Sie sind in Tabelle 1.1 beschrieben.

Progestagene, Androgene und Östrogene umfassen die Geschlechtshormone. Während die Progestagene hauptsächlich im Gelbkörper, dem Corpus luteum synthetisiert werden, ist der Hauptsyntheseort der Androgene der Hoden (Testis), während die Östrogene hauptsächlich in den Eierstöcken (Ovarien) synthetisiert werden (16).

1.4 Endogene Östrogene

Die endogenen Östrogene sind 17β -Östradiol (E2), Östron und Östriol. E2 ist das am stärksten wirkende Östrogen. Die Wirksamkeit von Östron beträgt nur ca. 30% und die von Östriol nur ca. 10% der biologischen Aktivität von E2. Vor der Menopause ist E2 das wichtigste endogene Östrogen im weiblichen Körper.

Die Biosynthese weiblicher Geschlechtshormone – Östrogene und Progestagene – besteht aus einer komplexen Kaskade. Das limbische System sekretiert spezifische Neurotransmitter oder Neuropeptide, die den Hypothalamus zur Produktion sog. Releasing-Faktoren anregen. Diese stimulieren ihrerseits die Hypophyse zur Ausschüttung von Luteinisierendem Hormon (LH), welches durch das Blut zu den hormonproduzierenden Organen transportiert wird. Unter seinem Einfluß werden dann im Ovar Östrogene und Progestagene in das

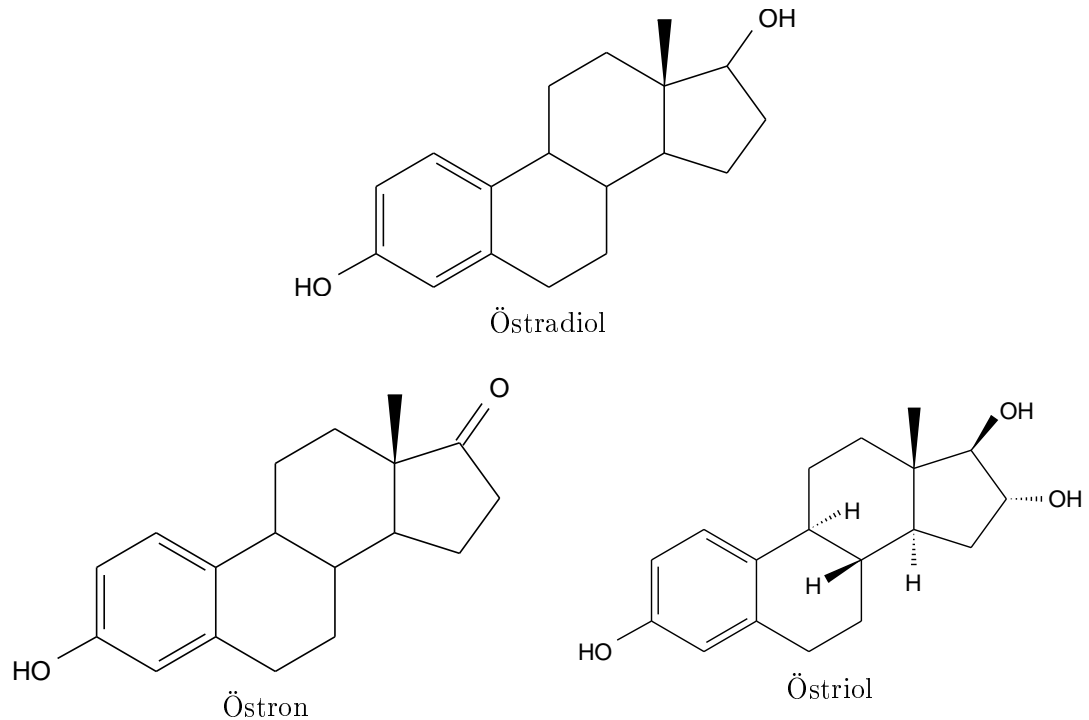


Abbildung 1.1: Endogene Östrogene

Blut ausgeschüttet.

Die Östrogene werden vorrangig in den die Follikel umgebenden Theka- und Granulosazellen produziert. Östradiol wird dabei entweder durch Aromatisierung des ebenfalls in den Thekazellen gebildeten Testosterons gebildet, oder durch Konversion von Östron zu Östradiol. Der Vorgang der E2-Biosynthese unterliegt einer zyklischen Schwankung. Die höchste E2-Produktion findet während der proliferativen Phase des Menstruationszyklus der höheren Primaten bzw. während des Östrus bei den meisten anderen Säugetieren statt. Die Schwankung des E2-Spiegels ist ein Grund, weshalb bei Tierversuchen, bei denen das östrogene System Untersuchungsgegenstand ist, häufig eine Ovariectomie durchgeführt wird. Während der Menopause sinkt die Produktion von E2 stark ab, sodass postmenopausal kaum noch E2 produziert wird.

Die Synthese von Östrogenen findet zu einem geringen Teil auch in der Nebennierenrinde und im Testis des Mannes statt. Daneben existiert auch eine geringe periphere Bildung von Östradiol durch Aromatisierung von Testosteron z.B. im Fettgewebe (16).

1.5 Wirkungsweise der Östrogene

1.5.1 Östrogenrezeptoren

Die meisten Wirkungen von E2 sowie anderer Östrogene und östrogenartig wirkender Substanzen im Menschen basieren auf der Interaktion mit den Östrogenrezeptoren α und β (ER α und ER β). Beide Rezeptoren gehören zur Genfamilie der nukleären Rezeptoren,

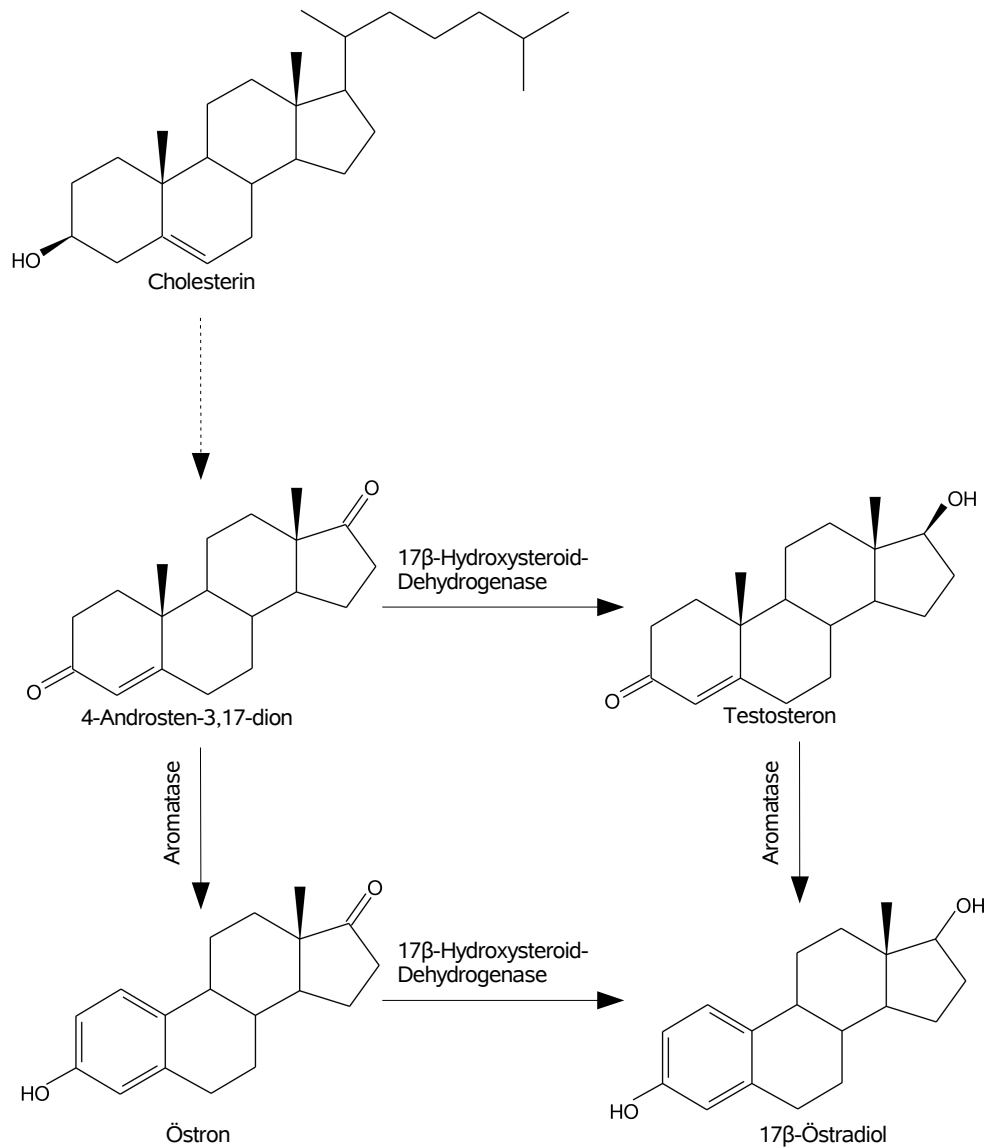


Abbildung 1.2: Biosynthese von Östradiol aus Androstendion über Östron und Testosteron.

welche eine evolutionär konservierte Struktur zeigen (17) und zu der außerdem noch die Glucocorticoid-, Mineralocorticoid-, Progesteron- und Androgenrezeptoren gehören (18). Diese Rezeptoren agieren im Allgemeinen als Homodimere, wobei sie hauptsächlich durch die Bindung des ligandengebundenen Rezeptors an *cis*-regulatorische DNA-Elemente in der Promotor-Region der Zielgene wirken. Durch physische Interaktion mit Kofaktoren und der Transkriptionsmaschinerie wird eine Regulation der Transkription dieser Gene erreicht. Aber auch Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren sind bekannt (siehe Abschnitt 1.5.4 auf Seite 8). Darüber hinaus wurden nichtgenomische Effekte beschrieben, die einem membranständigen Östrogenrezeptor zugeordnet werden (19).

Die Existenz eines Östrogenrezeptors, welcher verantwortlich für die spezifische Bin-

derung von 17β -Östradiol im humanen Uterus ist, wurde bereits im Jahre 1962 erkannt. Die Klonierung des zugehörigen Gens gelang 1985 Walter *et al.* (20). Greene *et al.* sequenzierten 1986 eine cDNA für die gesamte kodierende Sequenz der ER α -mRNA aus MCF-7-Zellen (21). Die 1785 Nukleotide der cDNA korrespondieren mit einem Polypeptid von 595 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 66,2 kDa. Das Gen ist auf Chromosom 6 (6q25.1) lokalisiert (20, 22).

Gleichzeitig mit dem ER β der Ratte (23) wurde 1996 der humane ER β von Mosselman *et al.* als zweiter Östrogenrezeptor identifiziert, kloniert und charakterisiert (24). Seine DNA-Bindedomäne sowie die Ligandenbindedomäne sind homolog zu denen von ER α . Das Gen des humanen ER β befindet sich auf Chromosom 14 (14q22-q24) (24, 25). ER β besteht aus einem Polypeptid von 530 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 59,2 kDa.

Beide Gene bestehen aus acht Exonen. Zusätzlich zu den Transkripten voller Länge sind zahlreiche Spleißvarianten bekannt.

Die Rezeptoren besitzen sechs Domänen, die mit A bis F bezeichnet werden (siehe Abb. 1.3). Drei Abschnitte der Östrogenrezeptoren haben für die Funktion besondere Bedeutung. Zum ersten sind das die Domänen A und B am N-Terminus. Sie modulieren die Transkription auf gen- und zellspezifische Art und Weise durch die Aktivator-Funktion 1 (AF-1).



Abbildung 1.3: Struktur der Östrogenrezeptoren: **A/B** Aktivator-Funktion 1, **C** DNA-Bindedomäne, **D** Hinge-Region, **E** Ligandenbindedomäne, **F** Aktivator-Funktion 2 (Nach Nilsson *et al.* (26))

Weiterhin spielt die DNA-Bindedomäne (C-Domäne) eine entscheidende Rolle. Sie ist zwischen den verschiedenen nukleären Rezeptoren stark konserviert und besteht aus zwei funktionell verschiedenen Zink-Finger-Motiven. Dadurch wird die Interaktion des Rezeptor-Liganden-Komplexes mit der DNA ermöglicht. Auch für die Dimerisierung der Rezeptor-Ligandenkomplexe ist die DNA-Bindedomäne zuständig. Zwischen den DNA-Bindedomänen der beiden ER-Subtypen besteht eine 97%ige Sequenzhomologie (27).

Die dritte wichtige Domäne ist die Ligandenbindedomäne (E-Domäne, LBD), die mit der DNA-Bindedomäne durch die sog. Hingeregion verbunden ist. Ihr kommt eine besondere Rolle bei der Unterscheidung von Östrogen-Agonisten, -Antagonisten und sog. Partialagonisten zu (siehe Abschnitt 1.5.2). Die Bindung eines Agonisten bewirkt die Aktivierung des Rezeptors und ist damit Anstoß zur Aktivierung einer Vielzahl möglicher Signalwege (siehe Abschnitt 1.5.4 auf Seite 8 ff.).

Die Sequenzhomologie der LBD zwischen ER α und ER β beträgt nur 58% beim Menschen und 55% in den ERs der Ratte. Dies führt dazu, daß die Affinität einiger Substanzen zu den beiden Rezeptoren unterschiedlich hoch ist oder aber eine unterschiedliche transkriptionelle Antwort auf die Ligandenbindung stattfindet (23, 24).

Die Expression der beiden Östrogenrezeptoren beschränkt sich nicht auf die reproduktiven Organe. Auch in den meisten anderen Organen bzw. Geweben konnten Östrogen-

rezeptoren nachgewiesen werden. Die Gewebsverteilung der beiden Subtypen ist dabei unterschiedlich. So ist in Ratten ER β -mRNA in der Prostata und im Ovar stark exprimiert, während in Testis, Uterus, Lunge und Blase eine moderate Expression festgestellt werden konnte. Im Rückenmark, verschiedenen Abschnitten des Gehirns, der Hypophyse, der Epididymis und im Thymus wurde nur eine geringe ER β -Expression gemessen. In vielen Organen sind ER α und ER β koexprimiert. Allerdings ist z.B. in der Epididymis, dem Uterus, der Niere und der Nebenniere die Expressionsrate von ER α sehr viel höher als die von ER β (25, 28–34).

1.5.2 Ligandenbindung an den Östrogenrezeptor

Der primäre endogene Ligand der ERs ist das E2. Daneben existieren noch weitere endogene Östrogene, die ebenfalls, wenngleich mit schwächerer Affinität, an den ER binden. Es existieren jedoch zahlreiche andere meist exogene natürliche oder synthetische Substanzen, die an die LBD des Östrogenrezeptors binden können. Diese werden im Abschnitt 1.9 auf Seite 15 ausführlich diskutiert.

Die verschiedenen Liganden können entweder als Agonisten, Antagonisten oder Partialagonisten der ERs wirken. Entscheidend dafür ist die aus der Ligandenbindung resultierende Konformation der LBD. Diese bildet ein für alle LBD der nukleären Rezeptoren typisches dreilagiges α -helikales Sandwichmotiv. Der Ligand wird in einer hydrophoben Kavität gebunden. Von entscheidendem Einfluß auf die agonistische, antagonistische oder partialagonistische Aktivität des Liganden ist die aus der Ligandenbindung resultierende Konformation der terminalen Helix 12 (siehe Abb. 1.4). Wird die Kavität mit dem gebundenen Liganden von der N-terminalen Helix 12 abgedeckt, wie dies beispielsweise bei der Bindung des natürlichen Liganden E2 der Fall ist, wird eine Bindung von Koregulatoren an der AF-2 ermöglicht. Der Ligand wirkt dann als Agonist. Bei Bindung eines Partialagonisten, beispielsweise Raloxifen, wird die Helix 12, aufgrund sterischer Effekte der zusätzlichen Seitenkette des Raloxifens (siehe Abb. 1.8, S. 16) in eine Position gezwungen, die die Koaktivator-Bindestelle teilweise verdeckt. Die Bindung eines Antagonisten, wie zum Beispiel Fulvestrant, führt zu einer Blockierung dieser sekundären Bindestelle der Helix 12 durch den Liganden. Da nun auch die Bindestelle für Kofaktoren durch den Liganden blockiert ist, ist keine Kofaktor-Bindung möglich. Dieser Mechanismus konnte sowohl für den humanen ER α (35) wie auch für den ER β (36) in ähnlicher Weise bestätigt werden.

1.5.3 Koregulatoren

AF-1 und AF-2 sind auch die Stellen an denen die Interaktion mit Koregulatoren stattfindet. Nur die spezifische Interaktion mit Koaktivatoren führt zu einer maximalen Transaktivierung, während Korepressoren diese unterbinden. Viele dieser Proteine zeigen einige gemeinsame Merkmale. Zum ersten binden sie an den Transkriptionsfaktor (in diesem Fall ER α oder ER β) auf ligandenabhängige Art und Weise. Weiterhin können viele von ihnen direkt mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren. Andere wiederum besitzen eine enzymatische Aktivität, die im direkten Zusammenhang mit Genregulationsmechanismen steht. Dazu zählt beispielsweise die Chromatin-modulierende Histon-Acetyltransferase- (HAT) oder Histon-Deacetylase-Aktivität (HDAC). Häufig besitzen sie

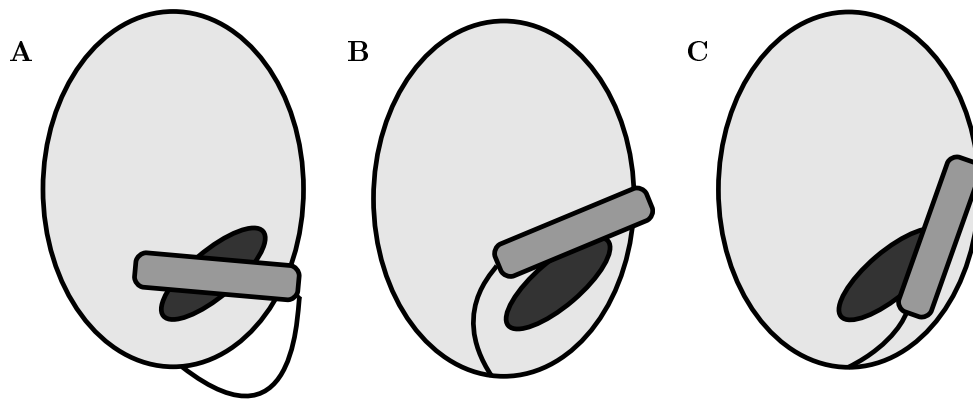


Abbildung 1.4: Ligandenabhängige Struktur der Ligandenbindedomäne des Östrogenrezeptors nach Pike *et al.* (37). Dargestellt ist die Ligandenbindedomäne (hell) mit der terminalen Helix 12 und der gebundene Ligand (dunkel). Bei gebundenem Agonisten ist die terminale Helix 12 über dem gebundenen Liganden angeordnet (**A**). Die Bindung eines Antagonisten verhindert durch dessen lange Seitenkette diese Konformation und zwingt die Helix 12 in eine um 120° verdrehte Position, wodurch die Bindung von Kofaktoren blockiert wird (**B**). Die Bindung eines Partialagonisten führt zu einer ähnlichen „quasi-antagonistischen“ Konformation der Helix 12, welche die Kofaktorbindestelle teilweise maskiert (**C**).

auch Transaktivierungs- oder Repressionsdomänen. Sie wirken also entweder durch die Beeinflussung der Chromatinstruktur oder als Adapter-Moleküle zwischen nukleären Rezeptoren und der Transkriptionsmaschinerie (38). Die Bedeutung der Koregulatoren für die Transaktivierung wird am Beispiel des ersten Kofaktors, der für den Östrogenrezeptor identifiziert wurde, deutlich. Es handelt sich dabei um den Steroidrezeptor-Koaktivator 1 (SRC-1). Seine Überexpression in verschiedenen Zellen führt zu einer extremen Steigerung der transkriptionellen Aktivität des aktivierten Östrogenrezeptors, sowie zu einem Verlust der partialagonistischen Eigenschaften von Tamoxifen, welches in diesem Fall als reiner Östrogenagonist wirkt. Es wird vermutet, daß in Zellen, in denen Tamoxifen als Agonist wirkt, bestimmte Koaktivatoren, und in Zellen, in denen Tamoxifen als Antagonist wirkt, bestimmte Korepressoren stärker exprimiert werden (39).

1.5.4 Wirkmechanismen

E2 liegt im Plasma zum Teil frei vor, ist jedoch häufig an Transportproteine, wie z.B. das Sex Steroid binding Protein gebunden (Übersicht in (40)). Östradiol kann aufgrund seiner Lipophilie die Membran der Zielzelle durchdringen und bedarf daher keines aktiven Transportmechanismus in die Zelle.



Abbildung 1.5: Konsensus-Sequenz des östrogenresponsiven Elements

Beim klassischen Wirkmechanismus bindet E2 im Zytoplasma an einen der beiden Östrogenrezeptoren α und β (siehe Abschnitt 1.5.1 auf Seite 4). Die Östrogenrezeptoren sind

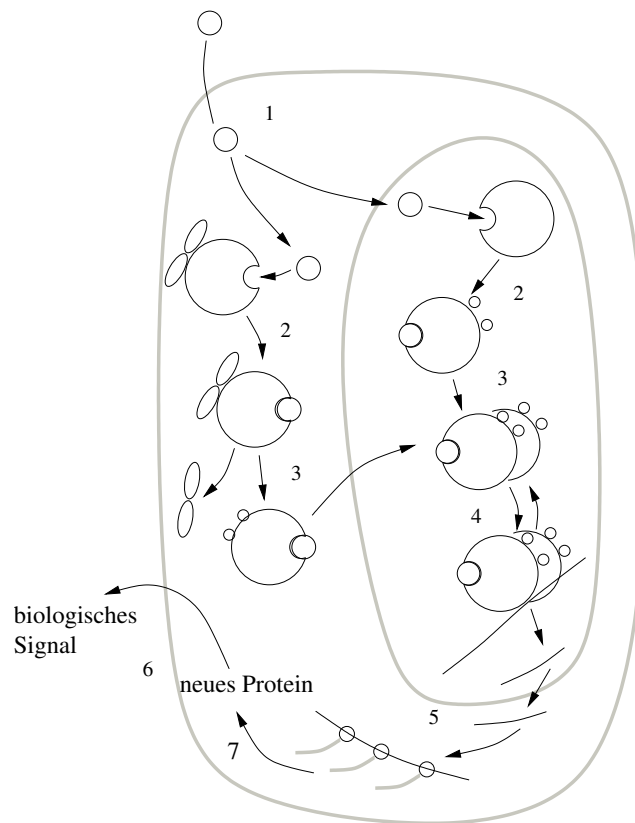


Abbildung 1.6: Klassischer und ligandenunabhängiger Wirkmechanismus von Östradiol nach Litwack und Schmidt (41). 1. Aufnahme des Hormons in die Zielzelle 2. Aktivierung des Rezeptors durch Bindung des Hormons und durch Phosphorylierung 3. Dimerisierung 4. Bindung des Rezeptor-Liganden-Komplexes an ein ERE auf der DNA 5. Synthese von mRNA und Protein des Zielgens 6. Biologisches Signal

durch die Hitzeschockproteine Hsp70, Hsp90 und andere Proteine stabilisiert (Übersicht in (42)). Diese dissoziieren im Falle einer Ligandenbindung ab und es kommt zur Phosphorylierung, zur Bindung von Koregulatoren sowie zur Bildung eines Homo- oder Heterodimers aus zwei Rezeptor-Liganden-Komplexen. Die Aktivität dieses Komplexes wird dabei neben den Koregulatoren auch durch den Phosphorylierungsstatus des Rezeptors beeinflusst. Das Dimer ist dann in der Lage, an ein palindromisches östrogenresponsives Element (estrogen responsive element, ERE) auf der DNA zu binden (Abb. 1.5), was zur Regulation der Transkription des nachgeschalteten Gens führt (Abb. 1.6)(43).

Die Bindung eines agonistischen Liganden führt dann zur Dimerisierung zweier Rezeptor-Liganden-Komplexe. Dabei sind sowohl Homodimere ($ER\alpha$ - $ER\alpha$, $ER\beta$ - $ER\beta$) als auch $ER\alpha$ - $ER\beta$ -Heterodimere möglich (44).

Daneben können E2-ER-Komplexe auch mit anderen DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren interagieren. Ein gut untersuchtes Beispiel dafür ist die Regulation der Transkription von Genen, welche ein AP-1-Element enthalten. Dabei handelt es sich um die Bindestelle für den Jun/Fos-Komplex. Ligandengebundener ER ist in der Lage mit Jun

zu interagieren (45). Dies führt zu einer verstärkten Bindung des Jun/Fos-Komplexes an ein AP-1-Element. Dadurch wird die Expression nachgeschalteter Gene stimuliert (46). Zu den so regulierten Genen zählen beispielsweise Ovalbumin, c-fos, Collagenase und der insulin-like growth factor I (IGF-I) (47–50).

Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Transkription von Zielgenen stellt die Bildung von ER/Sp1-Heterodimeren dar. Auf diese Weise wird beispielsweise die Expression von c-myc, Creatinkinase B, Cathepsin D, Retinsäurerezeptor α und HSP27 reguliert. In der Promotorregion all dieser Gene existiert eine Kombination einer ERE- und einer Sp1-Halbsite, welche für die östrogenabhängige Regulation der Transkription dieser Gene essentiell ist (51–55). Bei der östrogenabhängigen Regulation der Transkription des in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Progesteron-Rezeptor-Gens spielen sowohl der AP-1-Weg als auch der Sp1-Weg eine Rolle (46, 56).

Weiterhin ist die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor NF κ B bekannt. NF κ B ist im inaktiven Zustand an den Repressor I κ B gebunden. Wird NF κ B aktiviert, bildet er ein Homodimer. Der E2-ER-Komplex kann die Bildung von NF κ B Homodimeren unterbinden, indem er mit NF κ B ein Heterodimer bildet. Dies verhindert die Stimulation der Transkription NF κ B-regulierter Gene (26). Das bekannteste Beispiel eines solchen Gens ist Interleukin 6 (57), aber auch das in dieser Arbeit untersuchte COX2 wird wahrscheinlich auch auf diese Weise durch E2 reguliert (58–60).

Auch nichtgenomische Wirkmechanismen, welche durch membranständige ER vermittelt werden, sind beschrieben. Im Gegensatz zum klassischen Signalweg, bei dem eine Regulation der Genexpression stattfindet, handelt es sich hierbei um eine sehr schnelle Antwort, bei der andere Signalwege beeinflusst werden. So wurden beispielsweise in Endothelzellen membranständige ER α identifiziert, welche über ein G-Protein mit der endothelialen NO-Synthase (eNOS) gekoppelt sind. Dadurch wird eine ER-vermittelte schnelle Beeinflussung der eNOS-Aktivität und damit des Gefäßtonus möglich (61).

1.6 Wirkung von Östradiol auf den Uterus

E2 wirkt auf eine Vielzahl von Organen und Geweben. Es ist ein wichtiges Signal bei der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane. So wirkt es sich fördernd auf das Wachstum und die Differenzierung von Vagina, Ovar und der Mamma aus. Aber nicht nur in den weiblichen Geschlechtsorganen spielt E2 eine wesentliche Rolle. Die nachlassende Knochendichte bei postmenopausalen Frauen macht deutlich, daß E2 auch beim Erhalt und beim Aufbau der Knochenmasse eine wesentliche Rolle spielt. Die komplexe Wirkung auf das Gefäßsystem wird im Abschnitt 1.8 auf Seite 13 ff. diskutiert.

Eines der Hauptziele östrogenen Wirkung stellt daneben jedoch der Uterus dar, auf dessen Wachstum und Differenzierung es ebenfalls einen großen Einfluß hat. Insbesondere die Abläufe während des Menstruationszyklus sind im starken Maße durch E2 reguliert. Die Bildung von E2 wird dabei wiederum über Rückkopplungsmechanismen kontrolliert, welche zur Stimulation oder Repression der Bildung der Gonadotrophine Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) führen, die die Synthese der Steroidhormone im Ovar steuern (16).

Während der Follikelphase wird unter dem Einfluß von LH Progesteron und Testosteron gebildet, welches zu den benachbarten Granulosazellen diffundiert. Dort wird es unter Ein-

wirkung von LH zu E2 aromatisiert, was die Proliferation der Granulosazellen stimuliert. Das E2 regt aber auch das Endometrium zum Wachstum an und ist Auslöser für dessen Vaskularisierung, um eine Einnistung des befruchteten Eis zu ermöglichen.

Die maximale Östradiol-Konzentration zur Mitte des Menstruationszyklus bewirkt über eine nun positive Rückkopplung die Ausschüttung von LH. Dadurch wird wiederum die Ovulation, d.h. die Freisetzung des reifen Eis aus dem Follikel, eingeleitet. Die zurückbleibenden Follikelzellen bilden das Corpus luteum.

Während der anschließenden lutealen Phase wird das E2 hauptsächlich im Corpus luteum gebildet. Zusammen mit dem nun gebildeten Progesteron bewirkt E2 eine weitere Verdickung des Endometriums, dessen Zellen nun stärker differenzieren. Auch die Vaskularisierung des Endometriums schreitet weiter fort. Der nach einer Woche degenerierende Corpus luteum führt zu einer verringerten E2- und Progesteron-Produktion. Dadurch kann das Wachstum des Endometriums nicht weiter aufrecht erhalten werden. Es kommt zur Menstruation (16).

Während einer Schwangerschaft ist der E2-Spiegel jedoch 10- bis 100-fach erhöht. Dies unterbindet den Menstruationszyklus und fördert das Wachstum von Uterus und Fötus.

1.6.1 Der Uterotrophe Test in adulten ovariectomierten Ratten

Den Umstand, daß E2 das Endometrium zum Wachsen anregt, nutzt man im sogenannten Uterotrophen Test. Dieser wird eingesetzt, um in einem ersten *in vivo*-Screening Substanzen auf eine mögliche östrogene Wirkung zu überprüfen. Man kann den uterotrophen Test an juvenilen weiblichen Ratten durchführen, welche noch keine nennenswerte endogene E2-Produktion besitzen. Meist werden jedoch adulte weibliche Ratten eingesetzt. Diese werden einige Tage vor der Behandlung mit den Testsubstanzen ovariectomiert. Dadurch kommt die endogene Östradiolproduktion nahezu zum Erliegen und das Uterusgewicht geht stark zurück. Eine anschließende, typischer Weise dreitägige Behandlung mit Östradiol führt zu einem deutlichen Anstieg des Uterusgewichts. Auch andere Östrogene können diesen Effekt hervorrufen. Dieses Phänomen dient daher als Indikator für die Östrogenität einer Testsubstanz (62). Bei den Tierversuchen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurde daher ebenfalls eine Ovariectomie der Ratten durchgeführt und das Uterusgewicht bestimmt.

1.7 Das Gefäßsystem

Neben dem Uterus als klassischem Zielorgan östrogener Wirkung wurde in dieser Arbeit dem Gefäßsystem besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Es soll hier daher eine kurze Einführung in das Gefäßsystem an sich, und im folgenden Abschnitt in die Wirkung von Östrogenen auf das Gefäßsystem gegeben werden.

Als Blutgefäßsystem oder Blutkreislauf bezeichnet man die Gesamtheit der Blutgefäße. Diese haben vorrangig die Aufgabe, das Blut in die Peripherie des Körpers und von dort zurück zum Herzen zu transportieren. Der grundsätzliche Aufbau aller Gefäße ist weitgehend gleich (Abb. 1.7). Ihre Wand setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die Tunica intima oder kurz Intima besteht aus einer einzelnen Schicht von in der Längsachse des Gefäßes ausgerichteten Endothelzellen, einer darauf aufsetzenden Schicht lockeren Bindegewebes (Stratum subendotheliale), sowie daran anschließend der Membrana elastica

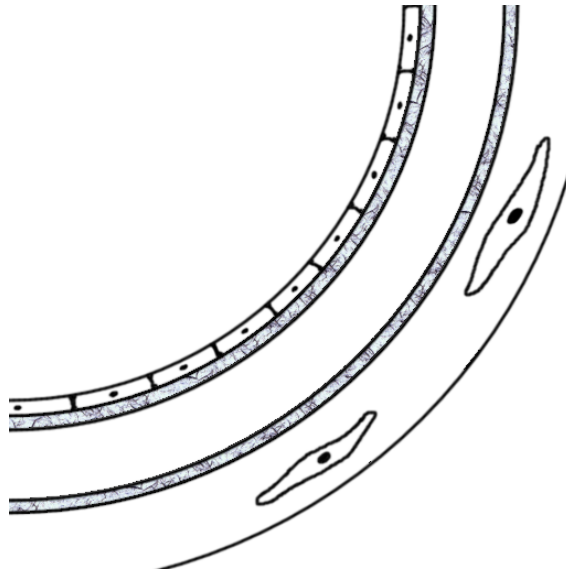


Abbildung 1.7: Querschnitt durch ein Blutgefäß. Deutlich zu erkennen sind die drei Schichten Tunica intima, Tunica media und Tunica externa, welche durch zwei Schichten elastischen Bindegewebes getrennt sind.

interna aus elastischem Bindegewebe. Sie dient dem Flüssigkeits- und Gasaustausch, sowie dem Austausch gelöster Stoffe zwischen Blut und umliegenden Gewebe.

Die Tunica media oder Media besteht aus einer je nach Gefäßtyp mehr oder weniger ausgeprägten Schicht ringförmig angeordneter glatter Muskulaturzellen. Sie dient der Stabilität des Gefäßes und der Regulation des Blutdrucks bzw. des Blutflusses zu bestimmten Regionen mittels Kontraktion bzw. Dilatation der glatten Muskulatur. Nach außen schließt sich meist noch eine Membrana elastica externa, ebenfalls aus elastischem Bindegewebe, an.

Die äußerste Schicht wird durch die Tunica externa, auch Adventitia genannt, gebildet. Hierbei handelt es sich um das umgebende lockere Bindegewebe zur Verankerung des Blutgefäßes in seiner Umgebung. Bei größeren Gefäßen enthält es Vasa vasorum. Dabei handelt es sich um feine Blutgefäße zur Versorgung der Gefäßwand. Bei kleineren Blutgefäßen erfolgt die Versorgung aus dem Lumen des Gefäßes selbst. Hier befinden sich auch Nervenenden des vegetativen Nervensystems zur Steuerung der Gefäßfunktionen.

Allgemein werden Blutgefäße grob in zwei Gruppen eingeteilt. Dabei handelt es sich zum einen um die Arterien und zum anderen um die Venen. Arterien transportieren das Blut vom Herz weg. Sie werden auch als Schlagadern oder Pulsadern bezeichnet nach dem an großen Arterien spürbaren Puls des Herzschlags. Die größte Arterie der Säugetiere ist die Aorta. Sie wurde daher für die im Tierversuch 2 durchgeführten Genexpressionsstudien verwendet. Ihr Durchmesser beträgt beim Menschen etwa drei Zentimeter. Arterien transportieren zumeist sauerstoffreiches Blut, nur die Arterien des Lungenkreislaufs enthalten sauerstoffarmes Blut. Die vaskuläre glatte Muskulatur ist in Arterien besonders stark ausgebildet, da diese dem Druck des Blutes entgegenwirken müssen.

Die Venen führen das Blut zurück zum Herzen. Dieses ist nun, außer im Lungenkreis-

lauf, sauerstoffarm. Da das Blut vorher durch die sehr engen Kapillaren fließt, um dort Sauerstoff abzugeben und CO₂ aufzunehmen, ist der Blutdruck in den Venen sehr gering. Die vaskuläre glatte Muskulatur der Media ist daher in den Venen wesentlich schwächer ausgebildet und Venenklappen verhindern das Zurückfließen des Blutes während das Herz kontrahiert. Die beiden größten Venen sind die obere und untere Hohlvene (Vena cava superior und Vena cava inferior). Die letztgenannte ist für diese Arbeit von besonderer Bedeutung, da sie in den Tierversuchen entnommen wurde und die Genexpressionsmuster östrogenregulierter Gene in ihr gemessen wurden.

1.8 Wirkung von Östradiol auf das Gefäßsystem

Östradiol spielt sowohl im gesunden Gefäßsystem eine bedeutende Rolle, als auch bei vielen häufig auftretenden Gefäßerkrankungen. So ist es zum Einen an der Angiogenese beteiligt (63, 64), zum anderen ist Östradiol ein bedeutendes atheroprotektives Molekül. Der vermutlich starke Einfluß von Östradiol auf die Gesundheit des kardiovaskulären Systems wird in Bevölkerungsstudien deutlich, die zeigen, daß prämenopausale Frauen im Vergleich zu Männern ein sehr geringes Risiko für Erkrankungen der koronaren Arterien besitzen. Nach der Menopause steigt dieses Risiko jedoch stark an. Nicht alle dafür verantwortlichen Mechanismen sind bekannt. Die atheroprotektive Wirkung scheint jedoch vor allem auf die Kombination von zwei primären Effekten zurückzuführen zu sein. Zum einen ist dies die Wirkung auf die arterielle Gefäßwand und zum anderen der Einfluß auf die Menge der im Blut zirkulierenden Lipide.

Die Wirkungen der Östrogene auf die Gefäßwand sind vielfältiger Natur. Einige setzen sehr schnell ein und gehören zu den nichtgenomischen Effekten. Dazu gehört zum Beispiel der kurzfristige Einfluß auf den Gefäßtonus über die Regulation der Aktivität von eNOS, welche über einen membranständigen ER erfolgt (61). Diese Effekte werden durch schnelle intrazelluläre Signalwege vermittelt.

Andere Effekte von E2 auf die Gefäßwand setzten jedoch erst nach Stunden oder Tagen ein und sind das Resultat transkriptioneller Ereignisse. Dazu zählt auch die längerfristige Beeinflussung der Produktion von Stickstoffmonoxid und damit die Steuerung von Gefäßtonus und Blutdruck durch die Regulation der Expression von eNOS (siehe auch Abschnitt 1.12.6 auf Seite 28). Weiterhin übt E2 durch die Regulation der Transkription von COX2 Einfluß auf die Prostaglandinbiosynthese aus (siehe auch Abschnitt 1.12.5 auf Seite 27).

Der Einfluß auf das Lipidprofil des Blutes ist nach neueren Erkenntnissen von wesentlich geringerer Bedeutung für die atheroprotektive Wirkung von E2. Dabei wird der LDL-Spiegel gesenkt, während der Spiegel des HDL, welches das Cholesterin zurück zur Leber transportiert, wo es metabolisiert wird, erhöht wird. Dies führt zu einer verringerten Akkumulation von proatherogenem LDL in der Arterienwand(65). Ein Teil dieser Wirkung von E2 auf das Lipidprofil wird dem Einfluß auf den Cholesterin-Metabolismus zugeschrieben. Aber auch auf die Expression des HDL-Struktur-Proteins HDL hat E2 offenbar einen Einfluß. Näheres zu diesen beiden Wirkmechanismen findet sich im Abschnitt 1.12.11 auf Seite 31.

Dabei wird ein biphasischer Mechanismus vermutet, wonach eine geringe (physiologische) E2-Dosis zu einer Zunahme des HDL, des ApoA1-Plasma-Spiegels und der ApoA1-mRNA-Expression führt. Weiterhin konnte eine Zunahme der CYP7A1-mRNA-Expression

und der CYP7A1-Aktivität beobachtet werden. Auch die MHG-CoA-Reduktase-Aktivität nahm zu. Bei höheren (pharmakologischen) Dosen nahm jedoch der ApoA1-Plasma-Spiegel wieder ab, wenngleich die mRNA-Expression von ApoA1 weiter zunahm. Auch die CYP7A1-mRNA-Expression, sowie die CYP7A1-Aktivität ging zurück. Ungeachtet dessen, wurde eine E2-konzentrationsabhängige Zunahme des HDL-Spiegels und bei hohen E2-Dosen eine Abnahme des Gesamt-Cholesterin-Spiegel beobachtet (66).

Daneben führt die HRT mit Östradiol und Progestin in postmenopausalen Frauen jedoch zu einem Anstieg der Inzidenz für Venenthrombosen sowohl bei gesunden Frauen (67) als auch bei Frauen mit kardiovaskulärem Syndrom (9).

Es galt lange Zeit als sicher, daß eine postmenopausale HRT durch Östrogen allein oder in Kombination mit Progestin die kardiovaskulären Risiken nach der Menopause ungefähr halbieren oder gar vollständig auf das Niveau vor der Menopause senken könnte (1, 3–8). Allerdings hatten alle diese Studien Schwachstellen im Design, kleine Patientenzahlen und Unterschiede in den zu vergleichenden Patientengruppen. Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden mehrere großangelegte randomisierte Doppelblindstudien durchgeführt.

Dazu zählt z.B. die Heart Estrogen-Progestin Replacement Study (HERS). HERS wurde durchgeführt, um die Wirksamkeit und Sicherheit der Hormonersatztherapie in Bezug auf kardiovaskuläre Erkrankungen in postmenopausalen Frauen zu ermitteln. Dafür wurden 2763 postmenopausale Frauen mit etablierter koronarer Herzkrankheit randomisiert mit kombinierter HRT oder Placebo behandelt (9). Das Hauptergebnis dieser Studie war ein Anstieg des Risikos für Herzinfarkte während des ersten Jahres der Behandlung und ein im Vergleich zur Placebogruppe niedrigeres Risiko in den Jahren 3 bis 5. In der HERS II genannten Studie wurden diese Patienten für weitere 2,7 Jahre beobachtet. Insgesamt konnte weder während HERS noch HERS II oder insgesamt eine signifikante Abnahme der Erkrankungen der Herzkranzgefäße oder der Herzinfarkte beobachtet werden (10). Darüberhinaus konnte ein Anstieg an Thromboembolien und Gallengangoperationen festgestellt werden (68).

In der noch größeren Studie der Women's Health Initiative (WHI) wurden 16608 gesunde postmenopausale Frauen mit einer Kombination von Östrogen und Progestin behandelt. Die geplante Dauer der Studie betrug 8,5 Jahre. Die Studie mußte allerdings bereits nach 5,2 Jahren abgebrochen werden. Es wurde festgestellt, daß das im Vergleich zur Placebogruppe angestiegene Risiko für Brustkrebs, koronarer Herzkrankheit, Schlaganfälle und Lungenembolien den Nutzen durch niedrigere Raten für kolorektales Karzinom, endometriales Karzinom und Oberschenkelhalsbruch überschritt. In Bezug auf alle kardiovaskulären Erkrankungen (venöse, wie auch arterielle) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (11).

Diese Ergebnisse und andere in jüngster Zeit durchgeführte Studien werfen die Frage auf, ob die klassische Hormonersatztherapie geeignet ist, den chronischen Folgen der Menopause insgesamt, aber auch speziell bezüglich des Gefäßsystems vorzubeugen. Sie machen deutlich, daß trotz der vielen Arbeiten, in welchen die Wirkungen von Östrogenen und anderen Steroiden auf das Gefäßsystem untersucht wurden und in denen viele Teilbereiche beleuchtet wurden, noch kein genaues Bild davon existiert, wie die Steroide das Gefäßsystem in seiner Funktion insgesamt beeinflussen.

Der Einfluß von Östrogenen auf die Angiogenese wurde anhand von ER α -Knockout-Mäusen und durch die Verabreichung von Östrogenantagonisten untersucht (69, 70). Diese

Experimente zeigten, daß die angiogene Wirkung von Östradiol über den Östrogenrezeptor vermittelt wird. Auch *in vitro* konnte ein angiogener Effekt von Östrogen auf die Proliferation von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen gezeigt werden. Besonders deutlich wird die angiogene Wirkung der Steroide jedoch bei der zyklischen Neovaskularisierung des Endometriums (71–73). Der entscheidende Wirkmechanismus dabei ist die Regulation der Transkription des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (63).

Angiogenese ist auch ein wichtiger Vorgang beim Tumorwachstum. Ab einer bestimmten Größe muß ein Tumor vaskularisiert werden, um weiter wachsen zu können. Zwar konnte beispielsweise anhand der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 gezeigt werden, daß Östrogene auch direkt auf die Proliferation von Tumorzellen wirken (74, 75), aber auch die angiogene Wirkung spielt eine Rolle bei der Entwicklung östrogenabhängig wachsender Tumoren wie beispielsweise an Tumoren, die aus in Mäuse implantierten MCF-7-Zellen entstanden sind gezeigt werden konnte (76).

1.9 Exogene Liganden der Östrogenrezeptoren

Exogene Liganden der Östrogenrezeptoren werden häufig auch als Xenoöstrogene bezeichnet. Dazu zählen z.T. industriell hergestellte Substanzen, deren östrogene Wirkung unbeabsichtigt ist und zumeist erst im Nachhinein entdeckt wurde. Substanzen, die solche ungewollten, meist negativen Effekte auf das Hormonsystem besitzen, werden endokrine Disruptoren genannt. Dazu zählt z.B. Bisphenol A (77–80) oder das Pestizid 1,1,1-Trichloro-2,2-Di(4-Chlorophenyl)Ethan (DDT)(81). Für diese Arbeit waren jedoch vor allem pflanzliche östrogen wirkende Substanzen (Phytoöstrogene) und das synthetische Antiöstrogen Fulvestrant von Bedeutung. Daneben werden hier noch die als Pharmazeutika entwickelten Selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren diskutiert, da diese für das Verständnis der vielfältigen Wirkungen östrogenwirksamer Substanzen von großer Bedeutung sind.

1.9.1 Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren

Der Begriff Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) bezeichnet eine Gruppe von Stoffen, die eine Affinität zu den Östrogenrezeptoren besitzt, aber deren Wirkung sich in Abhängigkeit von Organ, Gewebe, Zielgen oder auch zeitlichem Kontext entweder Östrogen-agonistisch oder aber -antagonistisch sein kann. Man bezeichnet sie daher auch als Östrogen-Partialagonisten. Bei diesen Substanzen handelt es sich meist um synthetisch hergestellte Stoffe, die medizinische Anwendung finden. Die partialagonistischen Eigenschaften der SERMs werden durch eine besondere ligandenabhängige Konformation der LBD der Östrogenrezeptoren hervorgerufen. Dies bewirkt wahrscheinlich, daß nur bestimmte gewebsspezifische Kofaktoren binden können (siehe Abschnitt 1.5.2 auf Seite 7).

Das erste zugelassene Medikament dieser Art war das Triphenylethylen-Derivat Tamoxifen (Abb. 1.8). Ursprünglich als Östrogen-Antagonist entwickelt und auch als solches zur Behandlung östrogenabhängig wachsender Mammakarzinome eingesetzt, zeigt es jedoch auch Östrogen-agonistische Effekte im Knochen und im Gefäßsystem. Auch im Uterus wirkt Tamoxifen partiell östrogen. Dies führt zu einem höheren Risiko der Bildung von Polypen und Karzinomen. Weiterhin steigt durch Tamoxifen-Behandlung die Inzidenz für thromboembolische Ereignisse. Trotzdem überwiegt der Nutzen von Tamoxifen bei der

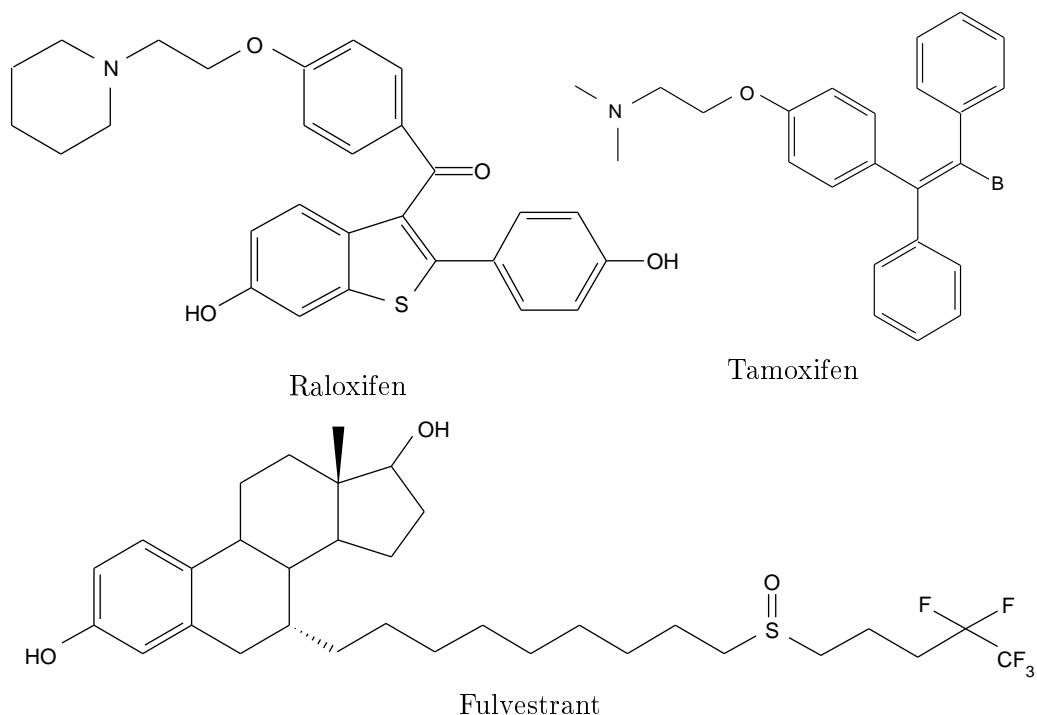


Abbildung 1.8: Strukturformeln der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren Raloxifen und Tamoxifen sowie des reinen Antiöstrogens Fulvestrant

Krebstherapie die Risiken in vielen Fällen bei Weitem, sodaß Tamoxifen bis heute erfolgreich bei der Behandlung von Mammakarzinomen eingesetzt wird (82).

Eine noch höhere Affinität zum ER als Tamoxifen besitzt Raloxifen. Hierbei handelt es sich um ein nichtsteroidales Benzothiophen. Da es im Knochen Östrogen-agonistische Eigenschaften zeigt, in allen anderen Geweben jedoch weitgehend antiöstrogen wirkt, wurde es vor allem zur Behandlung von Osteoporose entwickelt. Da Raloxifen auch im Mammakarzinom antiöstrogen wirkt und ein Rückgang der Inzidenz für Brustkrebs bei den mit Raloxifen behandelten Osteoporosepatienten festgestellt werden konnte, wird derzeit in einer klinischen Studie die Wirksamkeit von Raloxifen im Vergleich zu Tamoxifen in der Brustkrebsprävention untersucht (82).

1.9.2 Das Antiöstrogen Fulvestrant

Im Gegensatz zu den SERMs, welche teilweise antiöstrogene und teilweise östrogene Eigenschaften zeigen, handelt es sich bei Fulvestrant um ein reines Antiöstrogen. Es wurde unter dem Namen ICI 182,780 entwickelt und wird nun unter dem Markennamen FaslodexTM vertrieben.

Seine Bindung an die LBD des ERs reduziert die Dimerisierung des ER-Liganden-Komplexes und die Translokation in den Kern. Weiterhin begünstigt die Bindung von Fulvestrant an einen ER den Abbau des ERs. Die Blockierung der Bindung von Koaktivatoren verhindert weiterhin eine Bindung an EREs und damit eine Regulation der

Expression E2-regulierter Gene (83, 84). Da Fulvestrant ein Östradiol-Derivat darstellt, welches durch die Addition einer 7 α -Alkylsulphinyl-Seitengruppe gebildet wird, handelt es sich im Gegensatz zu Raloxifen und Tamoxifen um ein Steroid. Medizinisch findet Fulvestrant vor allem zur Behandlung von Mammakarzinomen Anwendung, die auf eine Tamoxifen-Behandlung nicht ansprechen (85).

1.9.3 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, die im tierischen Organismus Effekte hervorrufen, welche mit denen der endogenen Östrogene vergleichbar sind. Sie kommen in einer ganzen Reihe von Pflanzen vor. Viele davon sind eßbar. Dazu zählen beispielsweise Fabaceae (Sojabohnen, Rotklee, Erbsen, Linsen und Bohnen), Poaceae (Süßgräser, Getreide) und Rutaceae (Zitrusfrüchte). Sie lassen sich hauptsächlich vier Substanzklassen zuordnen: Isoflavone, Flavanone und Coumestane sowie die Lignane, die anders als die vorher aufgezählten Klassen nicht zu den Flavonoiden gehören (86). Eine östrogenartig wirkende Substanz in iCR ist noch nicht identifiziert. Der Extrakt wird hier deshalb als Ganzes diskutiert. Weiterhin sind hormonell aktive Lactone der Resorcinsäure bekannt, die von Schleimpilzen, wie z.B. *Fusarium spp.* produziert werden. Es handelt sich dabei also genau genommen um Mykoöstrogene. Ein bekanntes Beispiel dieser Substanzklasse ist Zearalenone .

Zu den Phytoöstrogenen, die zur Gruppe der Isoflavone gehören, zählen u.a. Genistein, Daidzein und deren Glykoside Genistin und Daidzin. Sie finden sich hauptsächlich in Pflanzen der Ordnung Fabales, wie z.B. Sojabohnen (*Glycine max* (L.) Merr.). Die Isoflavone Genistein und Daidzein machen deutlich, daß viele Phytoöstrogene nur in sehr geringem Umfang als freie, direkt wirksame Substanzen aufgenommen werden. Diese beiden Substanzen werden hauptsächlich als Glykoside (Genistin und Daidzin), als Methylether Biochanin A oder Formononetin aufgenommen. Die aktiven Substanzen werden über die intestinale Mikroflora freigesetzt oder metabolisiert. Die Metabolisierung führt im Fall des Daidzeins zur Bildung des hochaktiven Equols. Bei der Einschätzung der Wirksamkeit von Phytoöstrogenen ist zu berücksichtigen, daß diese Prozesse eine hohe interindividuelle Variabilität besitzen.

Mit den Isoflavonen strukturell eng verwandt sind die Coumestane., deren wirksamster bekannter Vertreter das Coumestrol ist. Es kommt hauptsächlich in der Luzerne (*Medicago sativa* L.) und in verschiedenen Kleearten (*Trifolium spp.*) vor.

Das 8-Prenylnaringenin als ein Vertreter der Flavanone ist ein besonders potentes Phytoöstrogen. Es stammt aus den weiblichen Blüten (Zapfen) des Hopfens (*Humulus lupulus* L.). Ein weiteres natürlich vorkommendes Phytoöstrogen dieser Substanzklasse ist das 6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin aus dem afrikanischen Baum *Monotes engleri* Gilg. Diese beiden Substanzen, sowie das synthetische Flavanon 7-Prenyloxynaringenin-4'-Azetat waren Gegenstand dieser Arbeit und sind in den Abschnitten 1.11.2, 1.11.2 und 1.11.2 auf Seite 23ff. genauer beschrieben.

Ähnlich wie die Isoflavone liegen die Lignane nicht frei vor, sondern werden von der Mikroflora des Darms freigesetzt. Sie finden sich hauptsächlich in Ölsaaten, wie Leinsamen (*Linum usitatissimum* L.), Raps (*Brassica napus* L.) sowie in Getreide, Gemüse und Früchten.

Der wichtigste bekannte Vertreter der ebenfalls östrogen aktiven Stilbene ist das Resve-

ratrol des Weins (*Vitis vinifera* L.). Besonders im Rotwein liegt es in hohen Konzentrationen vor und soll für das sogenannte „Französische Paradoxon“, d.h. die niedrige Inzidenz an Herzerkrankungen bei französischen Rotweintrinkern trotz hohen Fettkonsums, verantwortlich sein (Übersicht in (87)).

Phytoöstrogene werden im Allgemeinen zur Behandlung akuter Menopausensymptome wie Hitzewallungen und Gemütsschwankungen eingesetzt. Sie werden hauptsächlich als Nahrungsbestandteile bzw. -ergänzungsmittel, seltener auch in Form pharmazeutische Präparate angewandt. Dabei kommen meist die Pflanzen selbst (z.B. in Form von Sojaprodukten) oder Auszüge aus den entsprechenden Pflanzen zum Einsatz. Bislang finden keine aus Pflanzen isolierten oder chemisch synthetisierten Reinsubstanzen Verwendung (88). Die Studien, welche sich mit der Wirksamkeit und Sicherheit der Behandlung mit Phytoöstrogenen als alternative Methode zur Hormonersatztherapie beschäftigen, sind häufig nicht sehr umfangreich. In vielen Fällen ist die Frage der Wirksamkeit offen. Auch über mögliche Nebenwirkungen und Langzeitwirkungen z.B. auf das Gefäßsystem, sowie der Einfluß auf das Risiko einer Erkrankung an Mamma- und Endometriumskarzinom ist wenig bekannt (89). Die Datenlage zur Wirksamkeit und Sicherheit der häufig eingesetzten *Cimicifuga-racemosa*-Extrakte wird in Abschnitt 1.11.1 auf Seite 19 ff. eingehender diskutiert.

1.10 Überblick über die durchgeführten Versuche

Untersucht wurden die Flavonoide 6DMAN, 8PN und 7OPN sowie ein isopropanolischer Extrakt aus dem Rhizom von *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. (iCR) im Vergleich zur Wirkung von E2. Die Arbeit unterteilte sich dabei in zwei Aspekte. Zum einen wurden *in vitro*-Versuche durchgeführt, um die Testsubstanzen auf mögliche östrogene Wirkungen zu überprüfen. Zum anderen wurden zwei Tierversuche mit Ratten durchgeführt, um sowohl den Einfluß auf das Uterusgewicht als auch auf die Genexpression in Uterus und Gefäßsystem *in vivo* zu ermitteln.

Da als *in vitro*-Modell für das Gefäßsystem keine geeignete immortale Zelllinie zur Verfügung stand, wurden humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) gewonnen, kultiviert und für die Experimente eingesetzt. Die Experimente mit den HUVECs unterteilten sich dabei in drei Teile. Zum ersten wurden Proliferationstests durchgeführt, um Rückschlüsse auf einen eventuellen Einfluß auf die Angiogenese zu ziehen. Dies spielt z.B. bei der Vaskularisierung von Tumoren (90), bei der Vergrößerung atherosklerotischer Plaques (91) oder des inflammatorischen Synoviums bei rheumatischer Arthritis (92) eine entscheidende Rolle. Ein weiterer Test zur Überprüfung des Einflusses von Testsubstanzen auf die angiogene Aktivität ist der Matrigel-Test, bei dem der Einfluß auf die Bildung endothelialer Tubuli *in vitro* und damit auf die Differenzierung von Endothelzellen beobachtet werden kann. Dieser wurde ebenfalls mit HUVECs durchgeführt.

Da über die neue Substanz 7OPN keinerlei Daten bezüglich einer möglichen östrogenen Wirkung vorlagen, wurden weitere *in vitro*-Tests mit dieser Substanz durchgeführt. Dabei handelte es sich um sogenannte Screening-Assays, die der Ermittlung potentiell östrogenen Substanzen dienen. Einerseits kam hier ein hefebasierter Test zum Einsatz. Die verwendeten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) sind stabil transfiziert zum einen mit dem humanen Östrogenrezeptor α und zum anderen mit einem Östrogen-

responsiven Element (ERE), welches mit dem LacZ-Reporter fusioniert ist. Anhand der β -Galactosidase-Aktivität können Rückschlüsse auf eine östrogene Aktivität gezogen werden. Da dieser Versuch keine Östrogenität von 7OPN erkennen ließ, wird er in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben. Andererseits wurden MVLN-Zellen eingesetzt. Dabei handelt es sich um von ER α -positiven MCF7-Zellen abgeleitete Zellen, die mit einem Vitellogenin-A2-Promotor/Luziferase-Reporter-Konstrukt stabil transfiziert wurden. Die Luziferase-Aktivität dient dabei als Reporter für östrogene Aktivität.

Zur Untersuchung der Wirkung der Testsubstanzen *in vivo* wurden zwei Tierversuche durchgeführt und ausgewertet.

Zum einen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Versuch an ovariectomierten Wistar-Ratten durchgeführt, bei dem die zeitabhängige Wirkung der Flavonoide 6DMAN und 8PN untersucht werden sollte. Die Behandlungszeiten betrugen dabei 7 h, 24 h und 72 h. Als Kontrollgruppen wurden mit der Trägersubstanz (Negativkontrolle) und mit E2 (Positivkontrolle) behandelte Tiere eingesetzt. Zusätzlich gab es eine Gruppe von Ratten, die 72 h mit 7OPN behandelt wurde, um erste Daten über die Wirkung dieses Flavonoids *in vivo* zu gewinnen. Untersucht wurden dabei neben dem Uterusgewicht als klassischem Indikator östrogenen Wirkung der Einfluß der Testsubstanzen auf die Expressionsrate E2-regulierter Gene im Uterus sowie in der Vena cava. Die Vena cava wurde repräsentativ für das Gefäßsystem gewählt, weil sie ein ausreichend großes und aufgrund des relativ geringen Anteils glatter Muskulatur gut zu bearbeitendes Gefäß darstellt.

Der zweite Tierversuch wurde bei der Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG an ovariectomierten DA/Han-Ratten durchgeführt. Diese Tiere wurden 17 Tage lang mit iCR behandelt. Um eine mögliche östrogene Wirkung bestätigen zu können, wurde das iCR in einer weiteren Gruppe von Tieren in Kombination mit dem reinen Antiöstrogen Fulvestrant verabreicht. Als Kontrollen wurde je eine Gruppe Ratten mit folgenden Substanzen behandelt: 17 β -Östradiol (E2), Fulvestrant, sowie eine Kombination dieser beiden Substanzen. Als Negativkontrolle diente eine Gruppe ovariectomierter aber unbehandelter Tiere. Auch hier wurden sowohl Uterusgewicht, als auch die relative Expressionsrate E2-regulierter Gene im Uterus und der Vena cava bestimmt. Darüber hinaus war hier genug Zeit vorhanden, die Genexpression in der Aorta, als einem weiteren wichtigen Gefäß, sowie die Expression E2-regulierter, für die Funktion des Gefäßsystems bedeutender Gene in der Leber zu messen.

1.11 Überblick über die untersuchten Substanzen

1.11.1 isopropanolischer Extrakt aus dem Rhizom von *Cimicifuga racemosa*

In dieser Arbeit wurde ein isopropanolischer Extrakt des Rhizoms von *Cimicifuga racemosa* von der Firma Schaper & Brümmer GmbH & Co. KG, Salzgitter, Deutschland verwendet. *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt., auch bekannt als *Actea racemosa* L. ist eine ausdauernde Pflanze der Wälder des östlichen Nordamerikas. Sie gehört zur Familie der Ranunculaceae, wird ca. 1,20 m bis 2,40 m hoch und besitzt große wechselständige, dreiteilige, doppelt gefiederte Blätter. Die langen stabförmigen weißen Blüten stehen in Trauben. Ihr auffälligstes Merkmal sind die vielen großen Staubblätter aus schmalen Filamenten und weißen Antheren. Die Früchte bestehen aus einer trockenen ovalen gerippten Kapsel mit einer ventralen Naht. Darin befinden sich acht bis zehn braune dreieckige Samen in zwei Reihen. Die

Blütezeit ist je nach Region zwischen Mitte Juni und Anfang August. *Cimicifuga racemosa* wächst vorzugsweise an Hängen in schattigen dichten Wäldern. Ihr natürliches Vorkommen erstreckt sich im Osten von Massachusetts bis South Carolina, im Westen bis Arkansas und Missouri. Im Norden reicht ihr Verbreitungsgebiet bis ins südliche Ontario.(93, 94)

Als Heilpflanze fand *Cimicifuga racemosa* schon bei den nordamerikanischen Ureinwohnern Verwendung. Allerdings gibt es nur wenige Informationen über die Krankheiten, bei denen die Traubensilberkerze angewandt wurde. Offenbar gibt es auch große Unterschiede zwischen den verschiedenen Völkern bezüglich der Beschwerden, bei denen *Cimicifuga racemosa* eingesetzt wurde. Bekannt sind u.a. die Anwendung als Mittel gegen Rheuma, zur Stimulierung des Milchflusses, gegen Nierenbeschwerden, gegen Müdigkeit, gegen Erkältungen, Rückenschmerzen und Verstopfung, als Einschlafmittel für Babies und zur Senkung von Fieber. Dabei wurden verschiedene Teile der Pflanze auf verschiedene Art verabreicht. Bekannt sind die Zuberetung von Tees und das Vergären der Wurzeln zu einem alkoholischen Getränk. Dieses soll auch eine anregende, harntreibende, fiebersenkende, den Eintritt der Monatsregel fördernde und gefäßerweiternde Wirkung gehabt haben. Die Blätter wurden zur Behandlung von wunden Stellen bei Babies eingesetzt.(93)

Abgesehen von der Nutzung durch die Ureinwohner Nordamerikas fand die Traubensilberkerze erst Anfang des 19. Jahrhunderts Anwendung in der Hausmedizin. Dies ist zurückzuführen auf eine Veröffentlichung von William Hand 1818(95), der dem Wurzelaußguß darin eine fiebersenkende und harntreibende Wirkung zusprach. Die erste neue Anwendung, die bei den Indianern noch nicht bekannt war, war die Verwendung gegen Pocken. Dazu kamen noch die Anwendung bei verschiedenen Nervenleiden, Rheuma, als schweißtreibendes Mittel bei Fieber und andere. Gegen Mitte des 19. Jahrhunderts begann man in den Veröffentlichungen, sich auf die Anwendung bei Frauenleiden zu konzentrieren. Allerdings verlor *Cimicifuga racemosa* gegen Ende des 19. Jahrhunderts als Heilmittel an Bedeutung.(93)

In Europa wurde die Traubensilberkerze in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts vorrangig als Homöopathikum genutzt. Erst in den dreißiger Jahren wurde begonnen, *Cimicifuga racemosa* ernsthaft klinisch zu erproben und wissenschaftlich zu erforschen. Mitte der vierziger Jahre gab es erste Hinweise auf östrogenartige Wirkungen. Daraufhin fand in Deutschland eine große Zahl von klinischen Studien statt. Bis 1962 wurden 14 Studien oder Berichte über den *Cimicifuga racemosa*-Wurzelextrakt Remifemin™, die mehr als 1500 Patienten einschlossen, verfaßt. Diese waren zwar nach heutigen Standards nicht als kontrolliert zu bezeichnen, es zeigte sich aber, daß das Mittel sehr erfolgreich bei der Behandlung menopausaler und postmenopausaler Beschwerden, wie zum Beispiel Hitzewallungen, Depressionen, neurovegetativer Symptome und andere, angewendet werden kann. Später kam noch die Verwendung bei der Behandlung des prämenstruellen Syndroms dazu. Dabei wurden keine Nebenwirkungen beschrieben(93). In einer späteren Studie traten jedoch bei sieben Prozent der Probanden vorübergehende Magenbeschwerden auf (96). Die nachfolgenden Studien konnten die Ergebnisse bestätigen.

Die erste pharmakologische Studie fand 1985 statt. Darin wurden Serum-Konzentrationen von Hypophysen-Hormonen im Tierversuch gemessen. Nach einer dreitägigen Behandlung wurde eine deutliche Verringerung der Konzentration von Luteinizing-Hormone (LH), das mit dem Auftreten von Hitzewallungen in Verbindung gebracht wird, festgestellt. Demgegenüber blieb die Serumkonzentration von Follikelstimulierendem Hormon (FSH) und Prolaktin unverändert. In dieser Studie wurde auch die Vermutung aufgestellt, daß

die aktiven Substanzen in dem Wurzelextrakt Triterpenglykoside seien(97). Diese Studie scheint frühere Spekulationen, daß der *Cimicifuga*-Extrakt östrogene Wirkung besitzt zu bestätigen.

Liske *et al.* führten eine klinische randomisierte Doppelblindstudie mit dem isopropanolischen Wurzelextrakt von *Cimicifuga racemosa* durch. Dabei wurden 152 Patientinnen mit klimakterischen Beschwerden mit entweder 40 mg oder 127 mg des Präparats pro Tag behandelt. Es wurde keine Veränderung der Hormon-Spiegel von LH, FSH, SHGB, Prolactin und E2 gemessen(98). Aus dieser Studie ergibt sich die Annahme, daß der Extrakt keine hormonelle Wirkung besitzt.

Auch im Brustkrebsgewebe scheint es keine östrogene, das heißt proliferationsfördernde Wirkung zu geben. Es wurde sogar eine Inhibierung der Proliferation von Brustkrebszellen festgestellt. Versuche, bei dem MCF7-Zellen mit einem isopropanolischen *Cimicifuga racemosa*-Extrakt behandelt wurden, lieferte das gleiche Ergebnis und führten zu der Hypothese, daß iCR antiöstrogene Eigenschaften besitzt (99, 100). Ob die Fukinolsche Säure, welche ein Bestandteil von iCR ist, eine proliferationsfördernde Wirkung auf MCF7-Zellen besitzt, ist umstritten. Andere phenolische Bestandteile, wie die Cimicifugischen Säuren A, B, E und F, Fukiische Säure und Kaffeesäure haben keine Wirkung auf die Proliferation von MCF7-Zellen (101, 102). Bestandteile von iCR, die eine proliferationshemmende oder apoptotische Wirkung auf MCF7-Zellen oder Mammakarzinome besitzen, sind bisher ebenfalls nicht beschrieben.

Neuere Untersuchungen ergaben einen positiven Einfluß von *Cimicifuga racemosa* auf die Knochendichte von ovariectomierten Ratten, die in Qualität und Stärke denen von Raloxifen entsprachen. Allerdings wird vermutet, daß dieser Effekt nicht ER-vermittelt ist (103). Klinische Studien liegen dazu noch nicht vor. *In vitro*-Versuche mit humanen Osteoblasten lassen jedoch einen Anstieg der mRNA-Expression von Osteoprotegerin erkennen. Hierbei handelt es sich um einen potenten Inhibitor der Knochenresorption. Es wird daher vermutet, daß iCR geeignet ist, den durch die Menopause eingeleiteten Rückgang der Knochendichte zu verringern (104).

Ein Tierversuch an ovariectomierten Ratten mit isopropanolischem *Cimicifuga racemosa*-Extrakt legt den Verdacht nahe, daß die Linderung von menopausalen Hitzewallungen durch *Cimicifuga racemosa* durch den Serotoninrezeptor vermittelt wird (105).

Bisher sind keine nennenswerten Nebenwirkungen von Extrakten aus *Cimicifuga racemosa* bekannt. Zwar wurde in einigen wenigen Fällen nach Einnahme von *Cimicifuga racemosa*-Extrakten oder Präparaten, welche *Cimicifuga racemosa*-Extrakt enthielten, ein akutes Leberversagen beobachtet (106, 107), allerdings konnte nicht schlüssig gezeigt werden, daß dieses tatsächlich durch den Extrakt von *Cimicifuga racemosa* ausgelöst wurde (108, 109). Desweiteren geht man davon aus, daß *Cimicifuga racemosa* weder toxisch noch mutagen ist (93).

1.11.2 Naringenine

Naringenin ist das Grundgerüst der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Flavanone. Zwar ist das östrogene Potential des Naringenins selbst sehr gering (110), aber bereits erste Versuche mit 8-Prenylnaringenin zeigten, daß die Substitution mit funktionellen Gruppen in Abhängigkeit von der Position zu einer mehr oder minder ausgeprägten Östrogenität führt (111). Dabei wurde deutlich, daß eine Prenylgruppe in Position 8 den stärksten

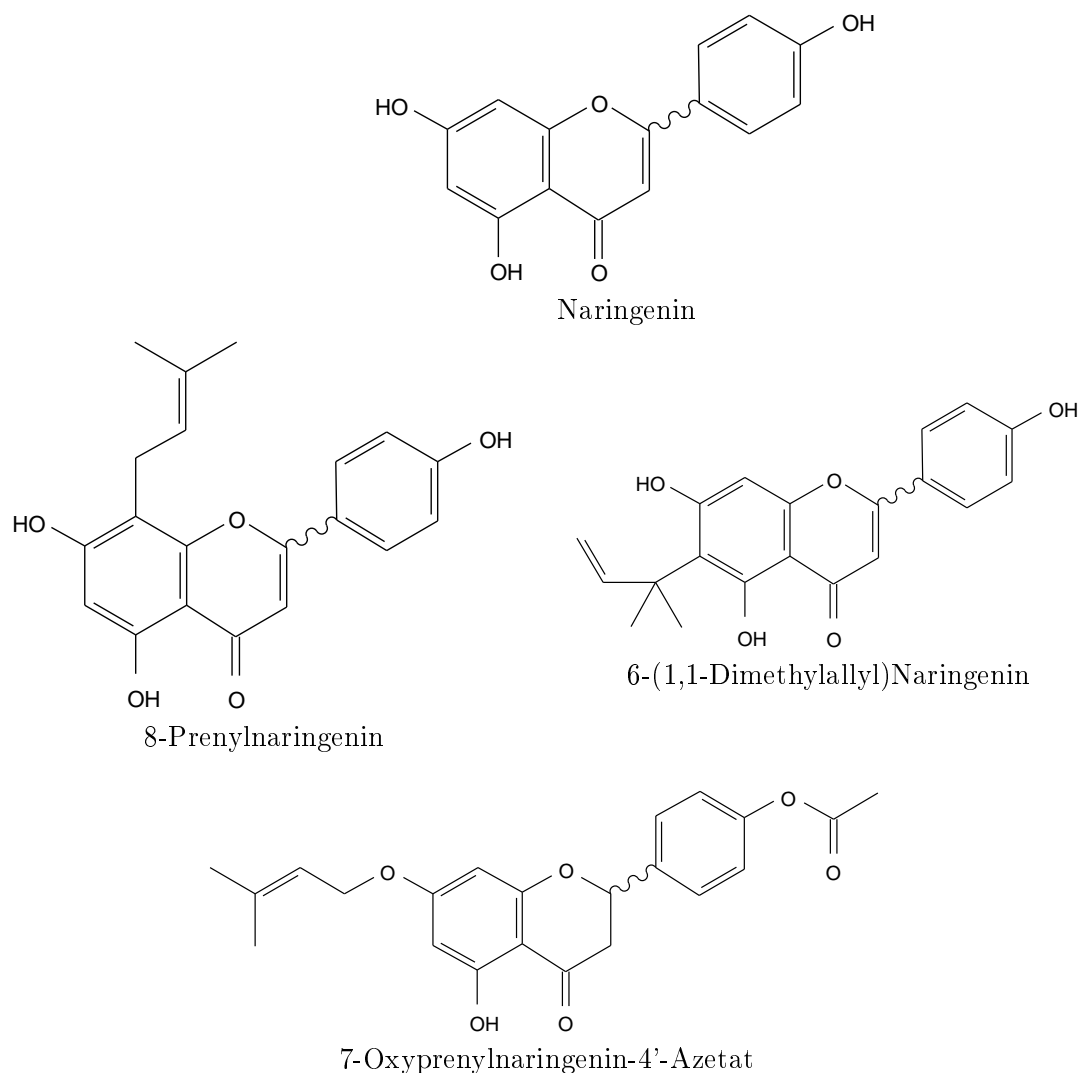


Abbildung 1.9: Strukturformeln des Flavanons Naringenin sowie dessen in dieser Arbeit untersuchten Derivate 6-(1,1-Dimethylallyl)Naringenin, 8-Prenylnaringenin und 7-Oxyprenylnaringenin-4'-Azetat

Effekt hat, während eine Substituierung mit einer Prenylgruppe in Position 7 oder 6 kaum Veränderungen der östrogenen Aktivität des Naringenins hervorrief. Trotzdem zeigte sich später, daß andere funktionielle Gruppen, wie die Dimethylallyl-Gruppe des 6DMANs auch in Position 6 zu einer östrogenen Wirkung führen können (110). Dies führte zu der Überlegung, ein weiteres durch chemische Synthese verfügbares Naringenin, das 7-Oxy-Prenylnaringenin-4'-Azetat in die Untersuchungen einzubeziehen. Abb. 1.9 zeigt die Strukturformeln aller hier untersuchten Flavanone.

6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin

6-(1,1-Dimethylallyl)naringenin (6DMAN) ist ein noch wenig untersuchtes Phytoöstrogen aus der Gruppe der Flavanone, welches in den Blättern des afrikanischen Baumes *Monotes engleri* Gilg. vorkommt. Es lag für die Versuche in chemisch synthetisierter Form vor (14). Seine östrogenen und antiandrogenen Eigenschaften wurden erst vor wenigen Jahren beschrieben (110, 112). Doch bereits 1997 beschrieben Seo *et al.* eine zytotoxische Wirkung von aus den Blättern von *Monotes engleri* isoliertem 6DMAN auf mehrere humane Krebszelllinien (113). Die Effekte auf den Uterus wurden bereits in einem dreitägigen uterotrophen Assay in Ratten untersucht. Dabei wurde 6DMAN in mehreren Konzentrationen (1,5 mg/kg, 7,5 mg/kg und 15 mg/kg) täglich subcutan injiziert. Die Uteri der so behandelten Tiere wurden mit denen einer unbehandelten, sowie mit denen einer mit E2 behandelten Kontrollgruppe verglichen. Interessanter Weise konnte kein Einfluß von 6DMAN auf das Uterusgewicht festgestellt werden, obwohl ein deutlicher Einfluß auf die mRNA-Expression der östrogen regulierten Gene Progesteron Rezeptor und Komplement C3 gezeigt werden konnte (114).

8-Prenylnaringenin

8-Prenylnaringenin (8PN) zählt zu den wirksamsten Phytoöstrogenen und ist ein wesentlich besser untersuchtes Flavanon als 6DMAN. Es kommt in den weiblichen Blüten (Zapfen) des Hopfens vor und konnte auch im Bier nachgewiesen werden (13). Dabei wurde auch dessen Östrogenität *in vitro* in einem Rezeptorbindungsassay gezeigt (12, 13). Erstmals wurde es jedoch schon 1998 als ein Bestandteil des Extraktes der südostasiatischen Pflanze *Anaxagorea luzonensis* A. Gray (Annonaceae) beschrieben. Dabei wurde auch seine starke östrogene Wirkung gezeigt (111).

Die Wirksamkeit *in vivo* konnte erstmals 1998 in ovariectomierten Ratten gezeigt werden. Es wurde deutlich, daß 8PN sowohl auf den Uterus, als auch auf die Knochendichte eine dem E2 vergleichbare Wirkung besitzt (115). Auch in Mäusen konnte ein uterotropher Effekt von 8PN gezeigt werden, welcher bereits bei mindestens 10-fach niedrigerer Dosis einsetzt als bei dem bekannten Phytoöstrogen Genistein (116). Ein androgener oder progestagener Effekt von 8PN wurde nicht nachgewiesen (117).

Ein weiterer dreitägiger uterotropher Assay mit Wistar-Ratten, zeigte ähnliche Ergebnisse bezüglich der Uterotrophie. Zusätzlich konnte auch eine Regulation der Expression der östrogenabhängig regulierten Gene ER α , Clusterin und Komplement C3 festgestellt werden. Die durch quantitative Real-Time-PCR gemessenen Effekte entsprachen weitgehend denen, welche durch E2 hervorgerufen wurden. Allerdings war das Ausmaß der Regulation durch 8PN geringer als es nach E2-Behandlung der Fall war (118). In der gleichen Arbeit konnte gezeigt werden, daß 8PN auch in der Leber die Expression E2-abhängig regulierter Gene beeinflusst. Wiederum entsprachen die Effekte denen von E2 bei geringerem Ausmaß der Regulation.

Zwar scheint 8PN keine organspezifische Wirkung zu besitzen und stellt daher in diesem Sinne kein SERM dar, allerdings konnte gezeigt werden, daß 8PN ein ER α -selektiver Agonist ist, d.h. seine Wirkung wird vor allem über den ER α vermittelt (119).

7-Prenyloxynaringenin-4'-Azetat

Ein weiteres Nebenprodukt der 8PN-Synthese war 7-Prenyloxynaringenin-4'-Azetat (7OPN). Hierbei handelt es sich ebenso um ein Mitglied der Gruppe der Flavanone. Es wurde bisher noch in keiner Pflanze gefunden sondern ist in diesem Fall ein Nebenprodukt der chemischen Synthese von 8PN. Es ist an zwei Stellen durch funktionelle Gruppen substituiert. Vermutlich wird die Acetyl-Gruppe in Position 4 jedoch, sobald das Molekül in die Zelle gelangt, durch die in jeder Zelle zahlreich vorhandenen Esterasen abgespalten, sodaß vor allem die Isoprengruppe in Position 7 als wirksame Modifikation in Frage kommt.

1.12 Überblick über die auf ihre mRNA-Expression untersuchten Gene

Die in den verschiedenen Organen der Versuchstiere sowie in der Primärzellkultur auf ihre Expressionsmuster untersuchten Gene lassen sich in drei Gruppen einteilen. Zum einen sind dies in unserer Arbeitsgruppe etablierte Markergene für östrogene Regulation, die eine besonders ausgeprägte Regulation nach Behandlung mit Östrogenen im untersuchten Organ zeigen und für die wenige andere Regulationsmechanismen bekannt sind. Sie sind daher auch gut zur Bestimmung des östrogenen Potentials von noch nicht untersuchten Testsubstanzen geeignet. Dabei handelt es sich insbesondere um Komplement C3 im Uterus, aber auch PR, Clu und die Östrogenrezeptoren α und β zählen dazu.

Weiterhin wurden Gene untersucht, die von hoher Relevanz für die Funktion des Organs bzw. für Erkrankungen oder Karzinome sind, deren E2-abhängige Regulation aber bisher weniger gut untersucht war, oder aber nicht immer einen geeigneten Marker für die Untersuchung östrogenen Regulation darstellen, da sie entweder häufig auch durch andere Faktoren reguliert werden oder aber nicht in jeder Situation östrogen reguliert sind. Die Proliferationsmarker PCNA und KI67 zählen hierzu, da sie keine spezifischen Anzeiger für eine östrogene Regulation darstellen sondern allgemein während verstärkter Zellproliferation, wie sie bei der zyklischen Vergrößerung des Uterus, bei der Tumorgenerese oder aber auch während der Angiogenese auftritt, hochreguliert werden. Auch VEGF und VEGFR2 sind nicht unbedingt Indikatoren einer östrogenen Wirkung. Sie sind jedoch auch als östrogen reguliert beschreiben und von herausragender Bedeutung für die Vaskularisierung gesunder Gewebe, wie auch von Tumoren und des sich zyklisch vergrößernden Endometriums des Uterus. Auch viele weitere untersuchte Gene, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden, wie eNOS, ACE, ApoA1, Cyp7A1 und COX2 unterliegen neben der östrogenen Regulation vielfältigen weiteren Regulationsmechanismen und stellen daher keine geeigneten Marker für östrogene Regulation dar. Über eine mögliche E2-abhängige Regulation des Ah-Rezeptor-Gens existieren bisher nur Vermutungen. Es wurde gewählt um den Einfluß des östrogenen Systems auf das Ah-Rezeptor-gesteuerte System des Schadstoffabbaus zu untersuchen.

Zur Untermauerung dieser Untersuchungen wurde die Expression einer dritten Gruppe von Genen gemessen. Diese Gene sind als Ah-Rezeptor-reguliert beschrieben und haben im System des Schadstoffabbaus eine große Bedeutung. Dabei handelt es sich um Cyp1A1, Cyp1A2 und NMOR.

1.12.1 Östrogenrezeptoren

Die beiden Östrogenrezeptoren α und β spielen nicht nur, wie im Abschnitt 1.5.4 auf Seite 8 dargestellt, eine entscheidende Rolle beim Mechanismus der östrogenen Wirkung, sie sind gleichzeitig selbst Gene, deren Expression E2-reguliert ist. Dadurch entsteht ein Regelkreis in Form einer Rückkopplungs-Regulation, der für die östrogenabhängige Regulation der Expression aller weiteren Gene von übergeordneter Bedeutung ist. Findet, wie man es zum Beispiel im Uterus beobachten kann, eine Herunterregulation der ER α - und ER β -Expression statt (120), kann dies die Regulation weiterer östrogenregulierter Gene, wie auch der Östrogenrezeptoren selber im zeitlichen Verlauf abschwächen.

Die E2-abhängige Regulation der Expression der ERs scheint sehr komplex zu sein. Für den ER α konnten beispielsweise mehrere Promotoren nachgewiesen werden, welche in Abhängigkeit vom zellulären Kontext in verschiedenen Kombinationen aktiv sein können. Ihre Aktivität wird offenbar durch nukleäre Rezeptoren über mehrere Sp1 und AP-1-Elemente sowie perfekte und imperfekte ERE-Halbsites und Palindrome reguliert. Darüber hinaus existieren eine Vielzahl weiterer Regulationsmechanismen (Übersicht in (121)).

1.12.2 Komplement C3

Komplement C3 ist ein zentraler Baustein des Komplementsystems. Dabei handelt es sich neben den Phagozyten um einen wesentlichen Bestandteil der angeborenen, nicht adaptiven Immunabwehr. Dieser evolutionär älteste Teil der Immunabwehr wirkt unspezifisch gegen eingedrungene Krankheitserreger unmittelbar nach dem diese in Kontakt mit dem Organismus kommen. Bei diesem Gen handelt es sich also um eine potentielle Schnittstelle zwischen dem Hormonsystem einerseits und dem Immunsystem andererseits.

Die Aktivierung von C3 spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Arteriosklerose. Hierbei handelt es sich, wie allgemein bekannt, um eine Entzündung die sich als Folge eines Einschlusses von low density lipoprotein (LDL) in die arterielle Intima entwickelt. Damit sich eine Entzündung entwickelt muß das LDL biochemische Veränderungen durchlaufen. Dieser Prozeß findet jedoch vermutlich auch im gesunden Gefäß statt, da die Modifizierungen zur nötigen Immunantwort führen, die eine Beseitigung des LDL einleitet. Diese Veränderungen des LDL werden wahrscheinlich durch ubiquitär vorhandene hydrolytische Enzyme verursacht. Daraufhin bindet das veränderte LDL an C-reaktives Protein, welches seinerseits zum einen das Komplementsystem aktiviert, andererseits aber dessen Aktivität reguliert, indem es die Aktivierung der terminalen Komplement-Kaskade inhibiert. Gleichzeitig werden Epitope exponiert, welche es Makrophagen erlauben, das Lipoprotein zu erkennen und aufzunehmen. Erst bei einer Überfrachtung dieses Systems kommt es jedoch zu einer pathologischen Entwicklung, welche zur Arteriosklerose führt. Dabei kommt es zu einer ungesteuerten Aktivierung des Komplements und anderer Effektoren des Immunsystems in den Läsionen (Übersicht in (122, 123)). Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, daß einerseits Komplement-Komplexe in arteriosklerotischen Läsionen festgestellt wurden, andererseits jedoch eine Komplement-Defizienz in Kaninchen vor Arteriosklerose schützt (124).

Besonders starker östrogenen Kontrolle unterliegt die C3-Expression im Uterus, wie in verschiedenen Experimenten in Ratten gezeigt werden konnte. (114, 118, 125). Die Hochregulation der C3-Expression ist dort auch auf Proteinebene sichtbar (126).

1.12.3 Clusterin

Bei Clusterin (Clu) handelt es sich um ein je nach Spezies ca. 75-80kDa großes heterodimeres Glykoprotein. Alternative Bezeichnungen sind testosterone-repressed protein message 2 (TRPM2), Apolipoprotein J (ApoJ) oder sulphated glycoprotein 2 (SGP-2). Clu wurde erstmals als Komponente der Flüssigkeit des Widderhodens beschrieben (127, 128). Auch im Menschen wurde Clu zuerst als Sekretionsprotein der Sertolizellen beschrieben (129, 130). Es ist jedoch auch in vielen anderen Körperflüssigkeiten, wie z.B. in humanem Plasma, Urin, Brustmilch und Liquor vorhanden (131, 132).

Das verbreitete Vorkommen sowie die starke Konservierung seiner Gensequenz lassen auf eine fundamentale biologische Bedeutung von Clu schließen (133). Es existieren auch eine ganze Reihe von Hinweisen auf die Funktion von Clu, wie z.B. Lipidtransport (134), Spermienreifung (127) und auch die Regulation der Komplementkaskade (135), sowie Apoptose (136) und Membran-Recycling (137). Interessanter Weise wurden auch einige neurodegenerative Krankheiten mit einer erhöhten Clu-Expression in Verbindung gebracht. Dazu zählen Hirntumoren, epileptische Foci (138), Alzheimersche Krankheit (139–141) sowie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (142).

Allerdings zeigen Knockout-Mäuse keine offensichtliche Veränderung im Wildtyp gegenüber dem Phänotyp (143). *In vitro*-Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß Clu eine Chaperon-ähnliche Funktion ausübt. Man nimmt daher an, daß es eine sHSP-artige zytrotektive Wirkung hat (144). Ob jedoch alle beschriebenen Funktionen auf diesen Effekt zurückgeführt werden können, bleibt weiterhin offen.

Diese Vielfalt der möglichen Funktionen bedingt auch eine entsprechend komplexe Promotorregion, um eine adequate hormonelle Regulation der Expression zu ermöglichen. Die Promotor-Region enthält daher eine ganze Reihe möglicher Bindungsmotive für Transkriptionsfaktoren. Bisher beschrieben wurden zwei AP-1-Bindungsstellen, eine AP-2-Bindungsstelle innerhalb der ersten 55 bp stromauf des Transkriptionsstartpunktes, außerdem acht Halfsites des Glukocorticoid- /Androgenresponsiven Elements und ein cAMP-responsives Element innerhalb des ersten Exons (145, 146).

Die östrogene Regulation von Clusterin im Endometrium konnte sowohl *in vitro* (RUCA-I-Zellen) als auch *in vivo* im gesunden Endometrium und in primären aus injizierten RUCA-I-Zellen gebildeten Tumoren demonstriert werden (147). Dabei kommt es im Endometrium zu einer Inhibierung der Clu-mRNA-Expression nach E2-Behandlung, aber zu einer erhöhten Clu-Expression sowohl in RUCA-I-Zellen als auch in Tumoren. Durch gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant konnten diese Effekte verhindert werden. In diesem Versuch konnte also gezeigt werden, daß Clu in gesundem Gewebe und in Tumoren durch Östradiol entgegengesetzt reguliert wird. Eine differentielle Genexpression ist auch für den weiblichen Genitaltrakt beschrieben worden. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus konnten zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zyklus unterschiedliche Mengen Clu-mRNA gemessen werden (148).

1.12.4 Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor (PR) vermittelt die physiologische Wirkung des Steroid-Hormons Progesteron. Es handelt sich also, genau wie bei den Östrogenrezeptoren um ein Mitglied der Steroid-Rezeptor-Superfamilie. Progesteron hat seine hauptsächliche Bedeutung in der

Etablierung und dem Erhalt einer Schwangerschaft. Das humane PR-Gen nutzt zwei unterschiedliche Promotoren und Transkriptionsstarts, um zwei Isoformen hPRA, und hPRB zu produzieren. Diese sind bis auf 165 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus von hPRB, welche für eine zusätzliche Aktivatorfunktion (AF-3) kodieren, identisch. Trotzdem unterscheiden sich beide Varianten stark in ihrer transkriptionellen Aktivität und physiologischen Funktion (149).

Obwohl sowohl hPRA als auch hPRB eine sogenannte inhibitorische Domäne enthalten, ist diese ausschließlich in hPRA aktiv, was darauf hindeutet, daß die beiden Rezeptoren unterschiedliche Konformationen besitzen, welche zu einer unterschiedlichen Rekrutierung von Kofaktoren führt. Dies führt vermutlich dazu, daß hPRA einen starken ligandenabhängigen Transrepressor für die Aktivität verschiedener Steroidhormonrezeptoren u. a. auch der ER darstellt, während hPRB in den meisten Zell- und Promotorkontexten als ebenfalls ligandenabhängiger transkriptioneller Aktivator wirkt, indem es als Homodimer an ein progesteronresponsives Element (PRE) in der Promotorregion des Zielgens bindet (150).

Trotz der Tatsache, daß der Promoter von PR kein palindromisches ERE besitzt, unterliegt die Transkription dieses Gens der östrogenen Kontrolle. In MCF-7-Zellen konnte eine Hochregulation sowohl der PR-mRNA-Expression als auch des Proteins festgestellt werden (151). Im Uterus von Ratten konnte dieser Effekt bestätigt werden, es zeigte sich dabei auch, daß die Proteinkonzentration zwar über den gesamten Untersuchungszeitraum anstieg, die mRNA-Expression jedoch nach 24 h ein Maximum erreichte und danach zurückging (152). Es sind mehrere Sp1-Elemente bzw. ERE/SP-1-Elemente sowie zwei AP-1-Elemente in der Promotor-Region von PR bekannt, deren Beitrag zur östrogenen Regulation der PR-Transkription in transfizierten Knochen- (U2OS), Uterus (HEC-1) und Brust- (SK-BR3)-Zelllinien gezeigt werden konnte (56).

1.12.5 Cyclooxygenase 2

Die Cyclooxygenase 2 (COX2), auch als Prostaglandin-G₂/H₂-Synthase 2 bezeichnet, ist eines von zwei Enzymen, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Metabolismus von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂(PGH₂) katalysieren. Bei dem anderen Enzym handelt es sich um COX1. PGH₂ wird dann zu den primären bioaktiven Prostaglandinen metabolisiert. Dazu gehören unter anderem PGE₂, PGI₂, PGD₂, PGF_{1α} und Thromboxan A₂. Während COX1 Prostaglandine für zelluläre Housekeeping-Funktionen produziert, ist COX2 induzierbar und spielt eine wichtige Rolle bei biologischen Ereignissen wie Verletzungen, Entzündungen und Proliferation (153, 154). Bereits 1971 wurde COX als Zielmolekül von Aspirin identifiziert (155). Weiterhin sind Prostaglandine an der Regulation der gastrointestinalen Motilität, und an der Immunantwort beteiligt (156). Herausgehoben werden soll hier die Beobachtung, daß COX2 offensichtlich eine große Rolle der E2-induzierten Vasodilation spielt, wie in einer Studie mit postmenopausalen Frauen gezeigt wurde (157). Auch bei der durch inflammatorische Zytokine induzierten Angiogenese spielt COX2 eine entscheidende Rolle (158).

Die Erkenntnis, daß vor allem COX2, nicht aber COX1 für die verstärkte Prostanoid-Produktion während einer Entzündung verantwortlich ist, führte zur Entwicklung einer ganzen Reihe von mehr oder weniger spezifischen COX2-Inhibitoren als Analgetika, Antipyretika und antiinflammatorische Mittel (159).

Die Regulation der COX2-Expression durch Steroide konnte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet werden. So konnte eine starke Regulation der COX2-Expression auf Proteinebene während des Menstruationszyklus im Endometrium von Schafen beobachtet werden (160), aber auch in den Follikeln von Ratten und Rindern wurde während der Ovulation eine starke hormonabhängige Induktion der COX2-Expression nachgewiesen (161–163). Im Uterus von ovariectomierten Ratten wurde ebenfalls eine zeitabhängige Stimulation der COX2-Expression durch E2 gezeigt. In der Vena cava wurde jedoch eine Herunterregulation der COX2-mRNA-Expression durch die Behandlung mit E2 festgestellt (164).

In bovinen endometrialen Epithelzellen konnte eine Inhibierung der COX2-mRNA-Expression durch E2 gezeigt werden, während in den endometrialen Stromazellen keine veränderte COX2-Expression festgestellt wurde (165). Im Gegensatz zu dem im vorherigen Abschnitt beschriebenen *in vivo*-Experiment an ovariectomierten Ratten, wo eine verringerte COX2-Expression nach E2-Behandlung in der Vena cava gezeigt wurde, konnte in HUVECs eine Zunahme der COX2-Expression auf Proteinebene gemessen werden, welche auch mit einer gesteigerten Enzymaktivität einherging. Dabei wurde ein Wirkmechanismus vorgeschlagen, der die Protein-Kinase C involviert, aber auch andere Wege wurden nicht ausgeschlossen (166).

Neben der Regulation der COX-Expression konnte aber auch eine Beeinflussung der COX-Aktivität im Gefäßsystem festgestellt werden. So fand man kürzlich heraus, daß E2 vermutlich das primäre Endprodukt von COX1 vom Vasconstrictor PGH_2 zum Vasodilator Prostacyclin verschiebt, was mit einem vergrößerten Durchmesser der mittleren Hirnarterie einhergeht (167).

Die Beispiele zeigen, daß die Regulation der COX2-Expression komplex ist. Selbst, wenn man nur den Einfluß von E2 betrachtet, zeigt sich ein von Organ, Gewebe, Zelltyp und Testsystem abhängiges Regulationsmuster. Offensichtlich werden dabei verschiedene Signalwege beeinflusst. Die COX2-Promotorregion besitzt in der Tat responsive Elemente für eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren. Dazu zählen unter anderem cAMP, IL6, $\text{NF}\kappa\text{B}$ und $\text{TGF}\beta$. Ein ERE wurde jedoch nicht beschrieben. In einigen Veröffentlichungen wurde eine COX2-Regulation über den $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weg nachgewiesen (58–60). Über diesen Weg wäre daher auch die östrogene Regulation von COX2 erklärbar, sofern es sich um eine Herunterregulation handelt.

1.12.6 Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Bei der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS oder NOS3) handelt es sich um eine von drei Isoformen der NO-Synthase, welche durch die Reaktion von L-Arginin, NADPH und Sauerstoff zu dem freien Radikal NO, NADP und Citrullin katalysiert (168). Bei NO handelt es sich um den primären endothelialen Relaxationsfaktor (endothelium derived relaxing factor, EDRF) (169). EDRF ist entscheidend für die Regulation des vasomotorischen Tonus und des Blutflusses. Dies wird durch die Inhibierung der Kontraktion der glatten Muskelzellen der Gefäßwand und der Thrombozytenaggregation erreicht (170). Im Gegensatz zu den anderen beiden NOS ncNOS (neurales NOS, NOS1), welches vor allem in Neuronen vorkommt, und iNOS (inducible NOS, NOS2), welches hauptsächlich in Makrophagen exprimiert wird, findet man eNOS vor allem im Endothel der Gefäßwände.

Bei eNOS handelt es sich um ein membrangebundenes Protein von 135 kDa. In ihrer

aktiven Form bestehen alle NOS aus zwei NOS-Monomeren, die mit einem Calmodulin-Dimer und einer Reihe weiterer fest gebundener Cofaktoren, darunter auch Häm, assoziiert sind (168).

Der akute Effekt von NO besteht in der Vasodilation. Da die NO-Produktion auch durch die Scherkräfte des Blutstroms aktiviert werden kann, existiert damit ein Rückkopplungsmechanismus, um den Blutdruck konstant zu halten. Ist die eNOS-Expression jedoch inhibiert, wird dieser Regelkreis außer Kraft gesetzt. In der Folge kommt es zu einer verstärkten Vasokonstriktion und Bluthochdruck. Neben dieser enormen Bedeutung für die vaskuläre Homöostase spielt NO jedoch auch eine große Rolle im Zellmetabolismus. Es hemmt die Zellatmung, indem es den apparanten K_m der Cytochrom-c-Oxidase für Sauerstoff erhöht.

Während die Expression von iNOS durch Zytokine induziert wird, galten ncNOS und eNOS lange Zeit als konstitutiv exprimiert. Inzwischen sind jedoch eine ganze Reihe von Regulationsmechanismen für die Expression von eNOS bekannt. Scherkräfte können ebenso einen Einfluß auf die Expression von eNOS haben wie Sauerstoffpartialdruck, Proliferation und Wachstumsstatus der Endothelzellen. Außerdem konnte der Einfluß von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, oxidiertem LDL, Lysophosphatidylcholin und Östrogenen und anderen Steroidhormonen auf die Expression der eNOS-mRNA nachgewiesen werden (Übersicht in (171)). Auch die Promotorregion von eNOS enthält offenbar mehrere Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren. Darunter sind Sp1, AP-1, AP-2, CF-1, und NF-1 (171).

1.12.7 Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) und VEGF-Rezeptor 2

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist ein Mitogen, welches im Gegensatz zu vielen anderen Mitogenen nur auf bestimmte Zellen, nämlich auf die vaskulären Endothelzellen wirkt (172). VEGF gehört zu den stärksten und spezifischsten angiogenen Faktoren. Es ist aktiv als glykosiliertes homodimeres Protein und bewirkt unter anderem endotheliale Zellproliferation, Migration, die Organisation der Endothelzellen in Röhren und eine verstärkte Permeabilität des Endothels. Dies alles sind Teile der angiogenen Kaskade.

Neben dem Protein mit voller Länge wurden noch drei weitere Spleißvarianten entdeckt (172, 173). Folkman stellte 1995 die enorme Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren für die Tumorentwicklung fest und schlug zur Krebsbekämpfung Eingriffe in den VEGF-Signalweg vor (174). Da VEGF den hauptsächlichen räumlichen und zeitlichen Vermittler der zyklischen Neovaskularisierung im Uterus darstellt, und dieser Prozeß ebenfalls E2-gesteuert ist (175), ist VEGF auch im Uterus ein interessanter Endpunkt zur Bestimmung östrogenen Wirksamkeit von Substanzen.

Die Wirkung von VEGF wird über die membrangebundenen VEGF-Rezeptoren (VEGFR) vermittelt. Diese existieren in den drei Isoformen VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3. VEGFR-2 wird hauptsächlich in vaskulären Endothelzellen exprimiert. Eine Regulation der Transkription von VEGFR-2 durch Östradiol konnte unter anderem in verschiedenen vaskulären Endothelzellen und in Brustkrebszellen gezeigt werden (176–178). Dieser Effekt wird hauptsächlich durch den $ER\alpha$ vermittelt und trägt zur angiogenen Wirkung von E2 bei (178).

1.12.8 Angiotensin I-Converting Enzyme

Die Dipeptidyl-Carboxypeptidase Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) ist ein Schlüsselenzym des Renin-Angiotensin-Systems. Dieses System spielt eine bedeutende Rolle bei der Kontrolle der Herzfunktion und des Blutdrucks. Es ist verantwortlich für die Umwandlung von Angiotensin I in den aktiven Vasokonstriktor Angiotensin II. Angiotensin II hat eine Reihe von Wirkungen auf das kardiovaskuläre System. Dazu gehören die systemische und die koronare Vasokonstriktion, aber auch die Stimulierung des Wachstums von vaskulären glatten Muskulaturzellen.

Daneben wird eine Vasokonstriktion auch durch den Abbau von Bradykinin erreicht. Dabei handelt es sich um ein Nonapeptid, welches einen potenten Vasodilator in den peripheren Arterien darstellt. Weiterhin konnte ein Abbau von Angiotensin (1-7), einem Vasodilator der Herzkranzgefäße, beobachtet werden. Bradykinin und Angiotensin (1-7) wirken über eine Vielzahl von Mechanismen unter anderem über die Freisetzung von NO. Auf diese Weise wechselwirkt ACE auch mit der Funktion von eNOS.

Durch das Zusammenspiel all dieser Effekte kann ein hoher ACE-Spiegel zu Bluthochdruck führen. ACE-Inhibitoren werden daher erfolgreich zu dessen Behandlung eingesetzt (Übersicht in (179, 180)).

Ein Hemmung der ACE-mRNA-Expression, sowie eine daraus folgende verringerte ACE-Aktivität nach Behandlung mit E2 konnte in medulla und Cortex der Nieren, den Lungen sowie der Aorta von Ratten festgestellt werden. Diese Herunterregulation der ACE-mRNA-Expression könnte auch ein Grund für die kardioprotektive Wirkung von ACE sein (181). Allerdings enthält der Promotor des ACE-Gens offenbar kein ERE. Etwa 300 bp stromauf des Transkriptionsstarts wurde beim Kaninchen eine AP-1-Bindestelle identifiziert. Es ist daher denkbar, daß die Regulation der ACE-mRNA-Expression durch E2 über die Bindung des Östrogenrezeptor-Liganden-Komplexes an das Fos-Jun-Heterodimer erfolgt (182). (siehe auch Abschnitt 1.5.4 auf Seite 8. Das humane ACE-Gen ist auf Chromosom 17 (17q23) lokalisiert (183)).

1.12.9 Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Einer der beiden untersuchten Proliferationsmarker ist PCNA. Dabei handelt es sich um ein stark konserviertes nukleäres Protein, dessen Expression mit dem Proliferationsstatus der Zelle korreliert. PCNA ist ein Kofaktor der DNA-Polymerase δ . Diese besitzt im Gegensatz zur DNA-Polymerase α , β und γ eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Diese Korrekturlesefunktion führt zu der Annahme, daß die DNA-Polymerase δ eine große Bedeutung für die Genauigkeit der DNA-Replikation besitzt (184).

1.12.10 KI-67

Bei dem zweiten Proliferationsmarker, dessen Expression im Rahmen der Arbeit untersucht wurde handelt es sich um das proliferationsspezifische Antigen KI-67. Es wird ausschließlich in proliferierenden Zellen exprimiert und wird durch den kommerziellen Antikörper KI-67 detektiert, welcher der Identifizierung proliferierender Zellen in Tumoren dient. Die Expression des Protein findet vor allem während der späten G1-, S-, G2- und M-Phase statt, während in der G0-Phase kein Protein nachgewiesen werden kann. Die genaue Funktion des Proteins ist unbekannt, allerdings suggerieren Antisense-RNA-Experimente,

daß KI-67 für die Proliferation von Zellen essentiell ist, da KI67-Antisense-mRNA zu einer Inhibierung der Proliferation von humanen glomerularen mesangialen Zellen führte (185).

1.12.11 Cytochrom P450 7A1

Wie im Abschnitt 1.8 auf Seite 13 beschrieben, wird vermutet, daß ein Teil des atheroprotektiven Effekts von E2 auf seinen Einfluß auf den Cholesterin-Metabolismus zurückzuführen ist. Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Abbaus von Cholesterin zu Gallensäure wird von Cytochrom P450 7A1 (CYP7A1), auch Cholesterol 7- α -Hydroxylase genannt, katalysiert. Schon lange ist ein Einfluß von E2 auf dessen Aktivität und Expression bekannt (186). Es stellt daher ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt für die östrogenartige Wirkung von Testsubstanzen auf das Gefäßsystem dar. Neuere Untersuchungen ergaben eine biphasische Wirkung von E2 auf Expression und Aktivität von CYP7A1 in Ratten. Dabei führte eine niedrige (physiologische) E2-Dosis zu einem Anstieg beider Endpunkte und eine höhere (pharmakologische) Dosis bewirkte eine Verringerung von CYP7A1-Expression und Aktivität (66).

1.12.12 Apolipoprotein A1

Bei dem Apolipoprotein A1 (ApoA1) handelt es sich um ein Strukturprotein des HDL, welches für den Rücktransport des Cholesterins zur Leber zuständig ist. Seine Expressionsrate entscheidet mit über das Verhältnis HDL zu LDL. Es konnte gezeigt werden, daß seine Expression in der Leber von Ratten nach Behandlung mit E2 dosisabhängig ansteigt. Dies führt zu einem günstigeren HDL zu LDL Verhältnis. Auch die HDL-Konzentration steigt trotz geringer werdender Gesamt-Cholesterin-Konzentration an. (66)

1.12.13 Aryl-Hydrocarbonrezeptor

Der Aryl-Hydrocarbonrezeptor ist ein intrazellulärer Rezeptor. Sein endogener Ligand ist bisher unbekannt. Allerdings besitzt er eine starke Affinität zu halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen. Diese treten in der Umwelt vor allem als Produkte von Nebenreaktionen bei der Produktion chemischer Erzeugnisse und bei der Müllverbrennung auf. Sie bewirken eine starke pleiotrope Toxizität einschließlich Teratogenität, Immunsuppression, endotheliale Erkrankungen und Tumorentstehung. Ein typisches Beispiel ist 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD, Dioxin). Der Wirkmechanismus dieser AhR-vermittelten Toxizität ähnelt dem der Steroidrezeptoren. Bei Abwesenheit von Liganden ist der AhR diffus im Zytosol verteilt und durch eine leichte Bindung an HSP 90, das Chaperon Immunophilin, das Cochaperon p23 und einige andere inaktiv. Die toxische Wirkung der aromatischen Hydrocarbone wird im Körper durch Aldehyddehydrogenasen, Chinonreduktasen, und verschiedene andere metabolisierende Enzyme, deren Expression durch den aktivierten AhR stimuliert wird, verursacht. Dabei bindet der ligandenaktivierte AhR als Heterodimer mit dem AhR-nuclear translocator (ARNT) an cis-aktive AhR-responsive Elemente, welche auch Dioxin-responsive Elemente (DRE) genannt werden (Übersicht in (187)).

Zu den so aktivierten Genen gehören eine ganze Reihe Genen, welche für Enzyme der xenobiotischen Biotransformation kodieren. Unter anderem sind dies einige Mitglieder

der Cytochrom-P450-Familie, wie CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1, UDP-Glucuronyl-Transferase, NAD(P)H-Menadion-Oxidoreduktase (NMOR), Klasse 3 zytosolische Aldehyddehydrogenase und Glutathion-S-Transferase A2 (GSTA2). Darüber hinaus scheint der AhR eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Phosphatidylcholin, dem Metabolismus von Arachidonsäure, der Deacetylierung von Lipiden, der Expression von Phospholipase A2, der γ -Glutamyltranspeptidase und der Proteinkinase C zu spielen (188–191). Durch umfangreiche biochemische und genetische Studien konnte ein Einfluß des AhR auf die Embryogenese, die Leberfunktion, die Funktion des Immunsystems, die Proliferation und Differenzierung von Zellen und die Organogenese nachgewiesen werden (192–197).

Während ein Einfluß des aktivierten AhR auf die Expression E2-regulierter Gene vielfach gezeigt werden konnte (198–201) und selektive AhR-Modulatoren zur Behandlung hormonabhängig wachsender Tumoren diskutiert werden, ist wenig Konkretes darüber bekannt, ob E2 und andere Östrogene einen Einfluß auf die Expression des AhR bzw. AhR-regulierte Gene hat. Ein *in vitro*-Versuch in Ratten zeigte eine zyklusgesteuerte AhR-Expression in der Leber, aber es konnte kein direkter Einfluß von E2 auf die Expression des AhR nachgewiesen werden (202). Auch in Granulosa-Zellen von Rhesusaffen führte eine Behandlung mit einem GnRH-Antagonisten zur Inhibierung der Steroidproduktion zu keiner veränderten AhR-Expression (203). Für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde der AhR und einige AhR-regulierte Gene jedoch auch deshalb ausgesucht, weil einige Flavonoide als Regulatoren der AhR-Aktivität beschrieben wurden, was zu einem Schutz vor der durch Dioxine ausgelösten Toxizität führen soll (204).

1.12.14 Cytochrom P450 1A1

Cytochrom P450 (CYP) ist eine Superfamilie von Hämoproteinen. Diese Proteine katalysieren die Monooxygenierung verschiedener endogener und exogener Substrate (205). Mitglieder der Familien CYP1, 2, 3 und 4 metabolisieren hauptsächlich exogene Chemikalien, beispielsweise Pharmazeutika, Nahrungsmittelzusätze und Umweltschadstoffe (206). Die CYP-Gene sind im allgemeinen durch ihre Substrate induzierbar. Bei der CYP1-Familie ist dafür ein AhR-ARNT-Heterodimer, welches an ein DRE bindet, zuständig (206).

Das Gen des Phase I Cytochrom P450 CYP1A1, welches unter anderem Benzo(a)pyren metabolisiert, ist auf Chromosom 15 (15q22-q24) lokalisiert. Es ist von CYP1A2 durch eine 23kB große Region getrennt, welche kein ORF enthält. Die beiden Gene sind gegenläufig orientiert, d.h. sie haben eine gemeinsame 5'-flankierende Region. Dies läßt vermuten, daß die beiden Gene einige gemeinsame Regulationsmechanismen besitzen. In diesem Bereich konnte ein Konsensus-DRE und weitere DRE-Halbsites gefunden werden (207).

1.12.15 Cytochrom P450 1B1

1994 wurde die cDNA eines weiteren humanen Cytochrom P450-Proteins entdeckt, dessen Gen ebenfalls ein DRE besitzt und dessen Transkription durch AhR-ARNT-Komplexe reguliert wird. CYP1B1 ist das einzige Mitglied der Subfamilie CYP1B der Cytochrom P450 Monooxygenasen. CYP1B1 scheint in geringem Maß in vielen humanen Geweben exprimiert zu werden. Northern-Blot-Analysen ergaben eine bis zu 100-fache Induktion der CYP1B1-Expression nach 24stündiger Behandlung mit 10 nM TCDD (208). In der Promotorregion des humanen CYP1B1 wurden neun DREs sowie zwei antisense-Sp1-Bindestellen

identifiziert, welche an der Regulation der CYP1B1-Transkription beteiligt sind (209, 210).

CYP1B1 ist auch deswegen für diese Arbeit interessant, weil es ein Schlüsselenzym bei der Metabolisierung von E2 darstellt (211). Das Produkt 4-Hydroxy-E2 wurde in Zusammenhang mit der Kanzerogenität von E2 gebracht, da es direkt oder indirekt DNA, Proteine und Lipide schädigt (212–214). Auch eine Stimulation der CYP1B1-Expression durch dessen Substrat E2 in MCF-7-Zellen konnte gezeigt werden. Diese Regulation wird über die Östrogenrezeptoren gesteuert (215).

1.12.16 Glutathion-S-Transferase A2 (GSTA2)

Hierbei handelt es sich um eine Glutathion-S-Transferase der α -Klasse. Eine ältere Bezeichnung ist GST Ya. Die Enzymfamilie der Glutathion-S-Transferasen beinhaltet eine ganze Reihe von zytosolischen, mitochondrialen und mikrosomalen Proteinen, die eine wichtige Rolle bei der Phase II der Metabolisierung von xenobiotischen Verbindungen spielen. Dabei werden elektrophile Zentren der Ziel-Substanzen mit der Sulphydril-Gruppe von reduziertem Glutathion konjugiert, was zu einer besseren Löslichkeit im zellulären und extrazellulären Milieu führt. Dadurch wird ein Ausscheiden dieser Stoffe ermöglicht.

Die zytosolischen GSTs, zu denen auch GSTA2 gehört, liegen entweder als Homodimere oder als Heterodimere vor, wobei diese offenbar nur aus zwei Proteinen der gleichen Klasse gebildet werden können (216). Das humane GSTA2 ist Teil eines Gen-Custers auf Chromosom 6, welches daneben noch weitere Glutathion-S-Transferasen (GSTA1, GSTA3, GSTA4 und GSTA5) sowie sieben Pseudogene enthält (217). Während für Nager ein Dioxinresponsives Element in der Promotorregion von GST Ya (in der Maus entspricht dies GSTA1) beschrieben wurde (190), konnte für die humanen GSTA1- und GSTA2-Gene kein DRE gefunden werden. Es ist daher möglich, daß sich die Regulation der GSTs der α -Klasse zwischen Nagern und Mensch deutlich unterscheidet (218).

1.12.17 NAD(P)H-Menadion-Oxidoreduktase 1 (NMOR1)

NMOR1 ist eine 2-Elektronen-Reduktase, die Chinone, welche bei der Oxidation phenolischer Metaboliten von Benzen entstehen, detoxifiziert. Bereits 1980 wurde ein vierter humaner Diaphorase-Locus auf Chromosom 16 identifiziert, der später in mehreren Schritten auf 16q22.1 konkretisiert werden konnte (219–221). Vermutlich ist DIA4 identisch mit NMOR1 (222). Es konnte eine fünffache Induktion der NMOR1-Aktivität in humanen Hepatoblastoma-Zellen nach Behandlung mit TCDD nachgewiesen werden. Es existiert nur ein einzelnes humanes NMOR-Gen, das als Matrize für mehrere cDNAs dient (222). Weiterhin wird die Expression von NMOR1 durch synthetische Antioxidantien und Extrakte verschiedener Gemüsearten, wie beispielsweise Broccoli induziert (223).

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Zelllinien

Tabelle 2.1 listet die Herkunft der verwendeten Zellen, sowie der eingesetzten Testsubstanzen und der verwendeten Kits, Enzyme und Chemikalien auf.

Tabelle 2.1: Bezugsquellen der eingesetzten Zellen, Chemikalien und Enzyme

BEZEICHNUNG	QUELLE
MVLN-Zellen	Dr. M. Pons, INSERM (Montpellier, France)
Östradiol	Sigma (Deisenhofen)
iCR	Schaper & Brümmer (Salzgitter)
Fulvestrant	TOCRIS Cookson (Bristol, Großbritannien)
HBSS-Puffer	Sigma (Deisenhofen)
DMEM/F12-Medium	Biochrom (Berlin)
Endothelial cell growth medium	Promocell (Heidelberg)
FKS	Biochrom (Berlin)
Trypsin	Biochrom (Berlin)
Gelatine	Sigma (Deisenhofen)
Matrigel™ Basalmembran-Matrix	BD Biosciences (Bedford, Ma., USA)
Luziferase-Assay Promega E1501	Promega (Mannheim)
BCA-Reagenz	Interchim (Montluçon, Frankreich)
TRIzol™	Invitrogen (Karlsruhe)
peqGOLD™ TriFast	PEQLAB Biotechnologie (Erlangen)
DNase- und Reverse-Transkriptase-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
MMLV reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)
PCR-Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
PlatinumTaq™ PCR-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
SybrGreen I	Sigma (Deisenhofen)
Oligonukleotide	MWG Biotech (Enzensberg) und Eurogentech (Seraing, Belgien)
Rattenfutter SSniff R10-Diet	SSniff GmbH, Soest

Selbst hergestellt wurde Phosphatpuffer-Saline (PBS). Die Aktivkohlebehandlung des fötalen Kälberserum (FKS) zur Herstellung von steroidfreiem FKS (DCC) wurde ebenfalls in unserem Labor durchgeführt. 8PN wurde chemisch aus Naringenin synthetisiert (14). 6DMAN und 7OPN waren Nebenprodukte dieser Synthese (14, 15). Humane Nabelschnur-

Tabelle 2.2: Verwendete Geräte

GERÄT	BEZEICHNUNG	Hersteller
Zellkulturflaschen und -platten		TPP (Trasadingen, Schweiz)
PCR-Platten und Abdeck- folien		Abgene Germany (Ham- burg)
Plattenphotometer	GENios	Tecan Deutschland (Crailsheim)
Küvettenphotometer	Specord 200	Analytik Jena (Jena)
Thermocycler für Inkuba- tionen	Primus	MWG Biotech (Enzens- berg)
Thermocycler für Real- Time-PCR	ICycler	BioRad Laboratories (München)

venen-Endothelzellen (HUVEC) wurden, wie im Abschnitt 2.3 auf S. 37 beschrieben, direkt aus humanen Nabelschnüren gewonnen.

Tabelle 2.2 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte und Materialien.

2.2 MVLN-Test

Die MVLN-Zellen wurden mit Dulbecco's Modified Eagles Medium/Hank's F12-Medium (DMEM/F12) und 10% FKS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Eine Passage vor der Durchführung des Versuchs wurde das Medium durch steroidfreies Medium ersetzt. Dabei handelte es sich ebenfalls um DMEM/F12, welches anstelle von unbehandeltem FKS 5% DCC enthielt.

Einen Tag vor Durchführung des Tests wurden die Zellen zu je 80000 Zellen/Well auf einer 24-Well-Platte ausgebracht und das Medium durch DMEM/F12-Medium mit einem DCC-Gehalt von nur 1% ersetzt.

Die Behandlung erfolgte nach Erneuerung des Mediums durch Zugabe von je 1 µl der in Ethanol gelösten Substanz auf 1 ml Medium.

Nach 24-stündiger Inkubation erfolgte die Messung der Luziferase-Aktivität. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen zwei mal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend das PBS vollständig entfernt. Pro Well wurden 100 µl des im Kit enthaltenen Lysispuffers zugegeben. Die Zellen wurden durch Schütteln und mittels eines Zellschabers abgelöst und anschließend vollständig lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch einminütige Zentrifugation bei 12000 g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden je 2 x 10 µl des Überstandes in die Kavitäten einer weißen lichtdurchlässigen 96-Well-Platte gegeben. Der Rest der Probe wird bei -20°C gelagert und für die Proteinbestimmung analog der in Abschnitt 2.4, S. 37 beschriebenen Methode verwendet. Die Messung der Lumineszenz erfolgte anschließend im Plattenphotometer. Die beiden Meßwerte der Doppelbestimmung

wurden anschließend gemittelt und auf 1 µg Protein umgerechnet.

2.3 Gewinnung und Kultivierung von primären Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

Die Nabelschnüre wurden sofort nach dem Abnabeln des Säuglings in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS) aufgenommen und bei 4°C gelagert. Nach maximal 24 h wurden sie in steriler Umgebung weiterverarbeitet. Dafür wurden die Nabelschnüre in 10 – 15 cm lange Stücke geschnitten. Die Vene wurde gründlich mit HBSS gespült. Daraufhin wurde in die Vene 0,01% Trypsin und 0,004% EDTA in HBSS gefüllt und 45 min bei 37°C inkubiert. Die Nabelschnur wurde anschließend gründlich massiert, um ein besseres Ablösen der Zellen zu erreichen. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit HBSS aus der Vene gespült und das Trypsin wurde mittels Medium inhibiert. Daran schloß sich eine fünfminütige Zentrifugation bei $900 \times g$ zur Pelletierung der gewonnenen Endothelzellen an. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert und in einer mit 1%iger Gelatine beschichteten Kulturflasche bei 37°C und 5% CO₂ in Endothelial Cell Growth Medium mit 5% fötalem Kälberserum kultiviert.

Die Zellen wurden nach 24 h gründlich mit PBS gespült, um alle Erythrozyten zu entfernen. Danach erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Zellkultur auf Ausbeute und Reinheit. Die Subkultivierung in neue gelatinebeschichtete Zellkulturflaschen erfolgte ca. alle drei Tage bei ca. 90%iger Konfluenz in einem Verhältnis von 1:3. Der genaue Zeitpunkt wurde durch mikroskopische Kontrolle ermittelt, da die Zellen je nach Ausbeute bei der Extraktion unterschiedliche Zeit benötigten, um eine 90%ige Konfluenz zu erreichen. Dafür wurde das Medium abgegossen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Die so von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelösten Zellen wurden anschließend für fünf Minuten bei $900 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in neue gelatinebeschichtete Zellkulturplatten ausgebracht. Eine Passage vor der Durchführung der Experimente wurden das Medium durch steroidfreies Medium ersetzt. Dabei handelte es sich wiederum um Endothelial Cell Growth Medium welches anstelle von unbehandeltem FKS mit 2% DCC (siehe Abschnitt 2.2, S. 36) versetzt wurde. Alle Versuche wurden in der 2. bis 4. Passage durchgeführt.

2.4 Proliferationstests

Der Proliferationsassay war in seiner Durchführung an den E-Screen mit MCF-7-Zellen angelehnt (224). Dabei handelt es sich um einen Gesamtproteinnachweis mittels Bicinchoninischer Säure (BCA) und Kupfer(II)-Sulfat (BCA-Test). Die verwendeten HUVECs wurden wie im Abschnitt 2.3 auf Seite 37 beschrieben gewonnen und kultiviert. Anschließend wurde eine 96-Well-Zellkulturplatte mit Gelatine beschichtet. Pro Well wurden 3000 Zellen in 100 µl Endothelzellmedium mit 2% DCC ausgebracht. Dafür standen 72 Wells zur Verfügung. Die übrigen Wells wurden für die Standardkurve des BCA-Tests benötigt.

Am zweiten Tag erfolgte die Behandlung mit den in Ethanol gelösten Testsubstanzen. Dafür wurden diese im Verhältnis 1:1000 mit Endothelzellmedium, welches wiederum

2% DCC enthielt, verdünnt und pro Well 100 µl dieser Verdünnung zugegeben. Dabei wurden je sechs Wells gleich behandelt.

Nach sechstägiger Inkubation erfolgte die Auswertung des Versuchs. Dafür wurde nach mikroskopischer Kontrolle der Zellkultur das Medium abgenommen und einmal mit 250 µl PBS gespült. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 25 µl 0,15 M NaCl-Lösung und anschließendes Einfrieren bei -80 °C. Das zur Proteinbestimmung nötige BCA-Reagens wurde durch Mischen von 25 ml BCA-Lösung und 0,5 µl des Kupfer(II)-Sulfat-haltigen BCA-Reagens B hergestellt. Zur Herstellung einer Standardkurve wurde in die freien Wells eine Verdünnungsreihe von Bovinem Serumalbumin (BSA) in Form einer Dreifachbestimmung nach dem in Tabelle 2.3 dargestellten Schema pipettiert.

Tabelle 2.3: Pipettierschema für die Erstellung einer Standardkurve für den BCA-Test zur Proteinbestimmung

VERDÜNNUNG NR.	STANDARD 1 mg BSA/ml	NaCl-LÖSUNG	BCA- REAGENS
0	0 µl	25 µl	250 µl
2	2 µl	23 µl	250 µl
4	4 µl	21 µl	250 µl
6	6 µl	19 µl	250 µl
8	8 µl	17 µl	250 µl
10	10 µl	15 µl	250 µl
12	12 µl	13 µl	250 µl
14	14 µl	11 µl	250 µl

Bei den zu bestimmenden Proben wird zu den in NaCl aufgeschlossenen Zellen ebenfalls je 250 µl BCA-Reagens pipettiert. Danach schloß sich eine 30minütige Inkubation bei 37 °C an. Dabei erfolgte die Bildung eines blauen Reaktionsproduktes durch die Reaktion des BCA-Reagens mit Cu^+ -Ionen, welche durch die Reduktion des Cu^{2+} durch die Aminosäuren Cystein, Tyrosin, Tryptophan sowie die Peptidbindungen der Proteine entstehen. Danach kühlten die Proben bis auf Raumtemperatur ab.

Die Auswertung erfolgte mittels einer Absorptionsmessung im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 565 nm. Das dazugehörige Programm Magellan ermittelt als Eichkurve ein Polynom dritten Grades als Regressionskurve durch die Mittelwerte der Meßpunkte der Verdünnungsreihe, wobei die Absorptionswerte in Abhängigkeit von der Proteinmenge betrachtet werden. Um einzelne offensichtliche Ausreißer eliminieren und Standardabweichungen der Meßwerte berechnen zu können, wurde nicht auf die automatische Auswertung des Programms zurückgegriffen, sondern die Gleichung der Eichkurve mit Hilfe der cardanischen Formeln nach der Proteinmenge aufgelöst. Somit konnte das Ergebnis für jeden einzelnen Meßwert ermittelt werden. Anschließend wurde nach Ausschluß der Ausreißer der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.5 Differenzierungstest

Für den Differenzierungstest wurde die Ausbildung von Röhren durch HUVECs beobachtet, wenn diese auf MatrigelTM kultiviert werden. Bei Matrigel handelt es sich um eine kommerziell erhältliche Basalmembran-Präparation, welche aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus-Sarkom extrahiert wurde. Sein Hauptbestandteil ist Laminin. Weiterhin besteht es aus Collagen IV, Heparansulfat-Proteoglykanen, Entactin und Nidogen (225) und weiteren Bestandteilen, wie z.B. einigen Wachstumsfaktoren, die auch natürliche Bestandteile des EHS-Tumors sind. Matrigel stellt ein effektives Substrat für die Anheftung und Differenzierung verschiedener epithelioider Zelltypen, u. A. auch Epithelzellen der Gefäße dar (226, 227). Dabei wurde die Bildung röhrenförmiger Strukturen durch die Endothelzellen beobachtet. Diese Differenzierung, bei der keine weitere Proliferation mehr erfolgt, beginnt schon nach zweistündiger Inkubation der Zellen auf Matrigel und ist nach 24 Stunden bereits abgeschlossen. Dabei wurde das Laminin als entscheidender Faktor identifiziert (227).

Auch für den Differenzierungstest wurden die verwendeten HUVECs wie im Abschnitt 2.3 auf Seite 37 beschrieben gewonnen und kultiviert. Danach wurde eine 24-Well-Zellkulturplatte mit 180 µl Matrigel pro Well entsprechend der beiliegenden Anleitung beschichtet. Pro Well wurden 250000 Zellen ausgebracht und 500µl Endothelzellmedium mit 2% DCC zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit den in Ethanol gelösten Testsubstanzen behandelt. Es wurde wiederum 1µl gelöste Substanz pro ml Medium eingesetzt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen in den einzelnen Wells mikroskopisch begutachtet und jeweils ein repräsentativer Ausschnitt fotografiert.

Da die Fotos aufgrund des dunkel gefärbten Matrigels nur einen recht schwachen Kontrast aufwiesen und durch die etwas ungleichmäßige Dicke der Matrigel-Beschichtung nicht durchgehend scharf waren, wurden zur besseren optischen Auswertung die gescannten Fotos mit einem Bildbearbeitungsprogramm nachbearbeitet. Dafür wurde ein Kantenfindungs-Algorithmus angewendet, um die netzartigen Strukturen der Zellverbände besser hervorzuheben. In keinem Fall wurde die Vergrößerung verändert und/oder Strukturen hinzugefügt oder entfernt.

2.6 Tierversuche

2.6.1 Dreitägiger Versuch mit Wistar-Ratten (Tierversuch 1)

Für diesen Versuch wurden juvenile Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 150 g bei Charles River Laboratories, Sulzfeld erworben. Sie wurden unter kontrollierten Bedingungen bei $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchte von 50 – 80%, sowie einem Beleuchtungsrythmus von 12 h hell und 12 h dunkel gehalten. Alle Ratten hatten freien Zugang zu Standard-Rattennahrung und Wasser. Für das Experiment wurden sechs Tiere pro Testsubstanz und Behandlungszeitraum eingesetzt.

Um die endogene Östrogenproduktion weitestgehend zu unterbinden, wurden alle Tiere ovariectomiert. Nach einer 14-tägigen Wartezeit, zur Senkung des endogenen Hormonspiegels, wurden den Tieren die in Rizinusöl gelösten Testsubstanzen, bzw. im Falle der Trägersubstanzkontrolle reines Rizinusöl subcutan injiziert. Die tägliche Behandlungsdosis betrug 10 µg/kg Körpergewicht E2, und 15 mg/kg Körpergewicht für 6DMAN, 8PN

und 7OPN. Die Dosis für die Naringenine entsprach der wirksamsten Dosis bei einem im Vorfeld durchgeführten Tierversuch, bei dem die Dosisabhängige Wirkung von 6DMAN und 8PN getestet wurde (114). Die Tiere wurden nach 7 h, 24 h bzw. nach 72 h mittels CO₂-Inhalation nach vorheriger Anästhesie durch O₂/CO₂-Inhalation getötet. Nach der sofortigen Entnahme aller experimentell zu untersuchenden Organe wurde das Uterusgewicht bestimmt und die entnommenen Organe wurden umgehend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.6.2 17-tägiger Versuch mit DA/Han-Ratten (Tierversuch 2)

Dieser Versuch wurde von der Firma Schaper & Brümmer (Salzgitter) durchgeführt. Es wurden je Gruppe 5-6 weibliche DA/Han-Ratten eingesetzt. Im Alter von ca. 90 Tagen und bei einem Körpergewicht von 150-210 g wurden auch diese Tiere beidseitig ovariectomiert. Alle Tiere wurden in identischer Umgebung gehalten und die Tiere hatten ebenfalls freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

Auch in diesem Fall begann die Behandlung 14 Tage nach der Ovariectomie. Die Tiere wurden dabei täglich mit 60 µl iCR/kg Körpergewicht oder 5 mg Fulvestrant/kg Körpergewicht behandelt. Als Positivkontrolle diente eine mit 200 µg E2/kg Körpergewicht behandelte Gruppe. Weiterhin wurde eine Gruppe mit einer Kombination aus E2 und Fulvestrant und eine weitere Gruppe, welche mit einer Kombination aus iCR und Fulvestrant behandelt wurde. Die dabei eingesetzten Mengen entsprachen den oben angegebenen. Eine sechste Gruppe diente als Negativkontrolle und blieb unbehandelt. iCR wurde über das Futter verabreicht, Fulvestrant wurde intramuskulär injiziert, wohingegen E2 subcutan injiziert wurde.

Nach 17-tägiger Behandlungszeit, in der die Tiere täglich äußerlich auf ihre Gesundheit überprüft wurden, wurden die Tiere ebenfalls mittels CO₂-Inhalation nach vorheriger Anästhesie durch O₂/CO₂-Inhalation getötet. Sowohl die Uteri als auch die Venae cavae und die Aorten wurden schnellstmöglich nach dem Töten entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff asserviert.

2.7 RNA-Extraktion und cDNA-Synthese

Für die Quantifizierung der mRNA-Expression in den untersuchten Organen wurde Gesamt-RNA extrahiert. Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurde anschließend ein DNase-Verdau durchgeführt, dessen Erfolg mittels einer PCR überprüft wurde. Daran schloß sich eine Reverse Transkription an. Die so gewonnene cDNA konnte im nächsten Schritt für die quantitative Real-Time-PCR eingesetzt werden.

2.7.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion von Gesamt RNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion mittels TRIzol™ bzw. peqGOLD TriFast™(228).

Die Gewebeproben wurden dafür tiefgefroren in ein stickstoffgekühltes Teflgefäß mit einer Metallkugel überführt und mittels eines Dismembrators 2 x 1 min homogenisiert. Zu den so vorbereiteten Proben wurde dann 1ml TRIzol bzw. TriFast gegeben. Anschließend

Tabelle 2.4: Zusammensetzung eines Ansatzes für den DNase-Verdau

KOMPONENTE	MENGE
Gesamt-RNA	3 µg
10x PCR-Puffer	1 µl
DNase I	5 Units
RNase Out	20 Units
H ₂ O	auf 10 µl aufgefüllt

wurden die Proben in Eppendorfgefäße überführt und entsprechend dem Standardprotokoll weiterverarbeitet. Dabei wurde die Zeit für die RNA-Fällung mittels Isopropanol auf 20 Minuten verlängert. Abschließend wurde zweimal mit Ethanol gewaschen. Die RNA-Pellets wurden je nach Größe in 12 bis 50 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

2.7.2 Konzentrationsbestimmung der gelösten Gesamt-RNA und Überprüfung der RNA-Qualität

Die RNA-Konzentration wurde mittels Extinktionsmessung im Küvettenphotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Das Verhältnis der Extinktion bei 260 nm und 280 nm (Extinktionsmaximum von Proteinen) diente als Maßstab für die Reinheit der extrahierten Nukleinsäuren. Ein Wert größer als 1,3 erwies sich als ausreichend für die weitere Verarbeitung.

Um sicherzustellen, daß die RNA nicht durch RNasen abgebaut wurde, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, bei der 1 µg RNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurde. Die rRNA-Banden sollten deutlich sichtbar sein und der RNA-Schmier über das ganze Größenspektrum verteilt vorliegen.

2.7.3 DNase-Verdau zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen

Ca. 3 µg mRNA pro Ansatz wurden für einen DNase-Verdau eingesetzt. Es wurde nach dem Protokoll von Maniatis *et al.* (229) gearbeitet. Tabelle 2.4 zeigt die Zusammensetzung eines Ansatzes. Dieser wurde anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl EDTA erfolgte die Inaktivierung der DNase durch Erhitzen des Ansatzes für 5 min auf 80 °C. Der Erfolg des DNase-Verdaus wurde mittels einer Real-Time-PCR überprüft (Abschnitt 2.8.4, S. 45), wobei 1 µl des RNA-Ansatzes eingesetzt wurde. Als Kontrollgen diente dabei die Untereinheit 1 der Cytochrom c Oxidase. Die verwendeten Primer sind aus Tabelle 2.6 auf Seite 43 ersichtlich. Es durften höchstens Spuren genomischer DNA ($C_T > 30$) meßbar sein.

2.7.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde ebenfalls nach Maniatis *et al.* (229) durchgeführt. Als Primer wurden Oligo-dTs (15mere) eingesetzt. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 2.5 dargestellt. Die Inkubationszeit betrug 60 min bei 42°C. Danach wurde die Reverse

Tabelle 2.5: Zusammensetzung eines Ansatzes für die cDNA-Synthese

KOMPONENTE	MENGE
DNase-Verdau-Ansatz	10 µl
10x PCR-Puffer	1 µl
MgCl ₂ (50mM)	2 µl
Oligo-dT (10 mM)	1 µl
MMLV RT	200 Units
RNase Out	20 Units
H ₂ O	auf 20 µl aufgefüllt

Transkriptase durch Erhitzung für 10 min auf 70 °C inaktiviert. Für die Verwendung in der PCR wurde die cDNA 1:2 mit reinem H₂O verdünnt.

2.8 Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion

Die Real-Time-PCR diene als quantitative Methode zum Vergleich der mRNA-Expression der untersuchten Gene. Ihr liegt die Annahme zugrunde, daß eine umgekehrt proportionale Abhängigkeit zwischen der Ausgangskonzentration einer cDNA und dem Zeitpunkt des Erreichens eines beliebig gewählten Schwellenwertes C_T durch die Konzentration des PCR-Produktes vorliegt. Dies ermöglicht eine Quantifizierung der cDNA relativ zur Trägersubstanz-Kontrolle. Um Schwankungen in der Effizienz der vorhergehenden Schritte, wie Zellkultur, Zellernte, RNA-Extraktion und cDNA-Synthese, auszugleichen, werden die Meßwerte nicht direkt verglichen, sondern mit den Meßwerten eines sogenannten Housekeeping-Gens verrechnet. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches in dem untersuchten Zusammenhang bekanntermaßen nicht reguliert wird. In diesem Fall kam dafür die Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase (1A) zum Einsatz, welches ein im Zusammenhang mit östrogenen Regulation bewährtes Housekeeping-Gen darstellt (114, 118, 125).

2.8.1 Primer-Design

Die für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendeten Primer wurden mittels des im Internet frei verfügbaren Programms Primer3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi/) erstellt. Dabei stellten sich im Laufe der Arbeit Einstellungen als besonders günstig heraus, die in Tabelle 2.6 auf Seite 43 dargestellt sind.

Die relativ geringe Produktlänge von 150 bis 250 Basenpaaren (zu Anfang der Arbeit ermittelte Primer sind allerdings zum Teil länger) soll für eine möglichst hohe Effizienz der PCR sorgen. Die so ermittelten Primer wurden dann zunächst mittels BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>) auf ihre Spezifität für die zu vervielfältigende Sequenz geprüft. Daraufhin wurde, um die Primersequenzen neben Primer3 mit einem zweiten Algorithmus zu überprüfen, zusätzlich der Oligoanalyzer von Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>) eingesetzt. Dieser nutzt u.a. das frei verfügbare Programm mfold ([42](http://-</p>
</div>
<div data-bbox=)

Tabelle 2.6: Parameter für das Primerdesign mittels Primer3. Für alle weiteren Parameter wurden die Standardeinstellungen übernommen

PARAMETER	WERT
Primerlänge	18-22
Produktlänge	150-250 bp
Schmelztemperatur der Primer (T_m)	59 °C – 61 °C
GC-Gehalt	40 – 60%
<i>Max Self Complementarity</i>	2
<i>Max 3' Self Complementarity</i>	1

www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/) um Haarnadelstrukturen in Oligonukleotiden zu finden. Dieser Schritt erwies sich als sinnvoll, um die Bildung von Primerdimeren zu minimieren. Tabelle 2.7 auf Seite 44 listet die verwendeten Primer für die Auswertung der Tierversuche an Ratten auf.

2.8.2 PCR-Optimierung

Für die Quantifizierung von cDNAs mittels Real-Time-PCR ist eine hohe Effizienz der jeweiligen PCR Voraussetzung, da sonst erhebliche Verfälschungen der Ergebnisse auftreten können. Daher wurden sowohl Primermenge als auch $MgCl_2$ für jede Zielsequenz individuell angepasst. Dabei wurde eine Matrix einzelner PCR-Reaktionen pipetiert, bei der alle Kombinationen von $MgCl_2$ (2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM) und Primermixmengen (0,5 µl, 0,75 µl, 1,0 µl, 1,5 µl) eingesetzt wurden. Daraus wurde anhand des Kurvenverlaufs der Real-Time-PCR in Verbindung mit der Schmelzkurve (siehe Abschnitt 2.8.6 auf Seite 47) die Kombination ermittelt, bei der eine möglichst hohe Effizienz der PCR-Reaktion, d.h. ein möglichst geringer C_t (siehe Abschnitt 2.8.5 auf Seite 46) bei gleichzeitig sauberem PCR-Produkt gegeben war. Das erhaltene PCR-Produkt wurde noch mittels Agarose-Gelelektrophorese auf die richtige Produktlänge überprüft.

2.8.3 Bestimmung der PCR-Effizienz

Eine hohe Effizienz der PCR-Reaktion ist essentiell, um eine zuverlässige relative Quantifizierung der Expression des jeweiligen Gens zu ermöglichen. Sie wird mit Hilfe einer Verdünnungsreihe des Templates ermittelt. Im Anschluß wird eine PCR jeder einzelnen Verdünnungsstufe durchgeführt.

Häufig war eine einfache Verdünnung der cDNA nicht möglich, da die Ziel-cDNA in zu geringer Konzentration vorlag. Weiterhin kam es oft zu Änderungen der PCR-Effizienz in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe, die zu unrealistischen Ergebnissen führten. Daher wurde zumeist auf eine Verdünnungsreihe des jeweiligen PCR-Produktes zurückgegriffen. Dies ließ eine zuverlässige Überprüfung der Effizienz über einen großen Konzentrationsbereich des Templates zu.

Alle PCRs wurden dabei als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die ermittelten C_T -Werte (siehe Abschnitt 2.8.5 auf Seite 46) wurden dann in einem Diagramm gegen den

Tabelle 2.7: Forward- und Reverse-Primer für die Real-Time-PCR sowie die Länge des resultierenden PCR-Amplicons

Gen	Primer	Größe des Amplicons
1A	5'- TGA GCA GGA ATA GTA GGG ACA GC-3' 5'-GAG TAG AAA TGA TGG AGG AAG CA-3'	261
ER α	5'-GGA AGC ACA AGC GTC AGA GAG AT-3' 5'- AGA CCA GAC CAA TCA TCA GGA T-3'	383
ER β	5'-CTA CAG AGA TGG TCA AAA GTG GAA-3' 5'-GGG CAA GGA GAC AGA AAG TAA GT-3'	216
C3	5'-ACA GCC TTC CCG GGA GCA TCA ACA-3' 5'-AGC GCA CCA CAG GAG GCA CAG AGT C-3'	276
Clu	5'-CCC TCC AGT CCA AGA TGC TCA ACA C-3' 5'-CCA TGC GGC TTT TCC TGC GGT ATT C-3'	303
PR	5'-CCC AGA CGA AAA GAC ACA AAA T-3' 5'-CCA AAG AGA CAC CAA GAA GTG AT-3'	222
COX2	5'-AAC TGT ATC CCG CCC TGC TGG TG-3' 5'-AGA CAG CCA CCA TCA ACG CAA GT-3'	284
KI67	5'-AAC CAG GAC TTT GTG CTC TGT AA-3' 5'-CTC TTT TGG CTT CCA TTT CTT C-3'	209
PCNA	5'-GAG CAA CTT GGA ATC CCA GAA CAG G-3' 5'-CCA AGC TCC CCA CTC GCA GAA AAC T-3'	158
ACE	5'-GTT ACC AGA CAA CTA TCC AGA GGG-3' 5'-ATT TCA AGG TAT GGT TGG ACA CTT-3'	218
eNOS	5'-CCC GGC GCT ACG AAG AAT GGA AGT-3' 5'-CAC CGG GTC TCC TGC CTT GAG TTG-3'	278
VEGF	5'-CTG CAA TGA TGA AGC CCT GGA GTG-3' 5'-ACC GGG ATT TCT TGC GCT TTC GTT-3'	221
VEGFR2	5'-GAA AAA GCC GGC CAG TGA GTG TAA-3' 5'-AGC GCA GTG TGG TCC CAG AGT CAA	344
CYP7A1	5'-ATT TGG ACA CAG AAG CAT TGA C-3' 5'-CGG TAA CAG AAG GCA TAC ATC C-3'	206
ApoA1	5'-CTG TGT ATG TGG ATG CAG TCA AG-3' 5'-GGT CCT TGT TCA TCT CGT TTC T-3'	221
AhR	5'-CAA CCA AAC CAA ACA ACA GAG A-3' 5'-ATC CAT CAT CTT TCA ACC CAT C-3'	197
CYP1A1	5'-TTA TGA CCA CGA TGA CCA AGA G-3' 5'-GCC CTT CTC AAA TGA CCT GTA G-3'	211
CYP1B1	5'-GTC AAA GGC AAC AAT CAA TCA A-3' 5'-GCT AAA CAA CCT CCC AAG ACA A-3'	227
GSTA2	5'-GCC AGC CTT CTG ACC TCT TT-3' 5'-GCT CCG CTA AAA CTT GAA AAT C-3'	161
NMOR	5'-AAA CAA TGG CTG AGG GAC-3' 5'-ATT TCC ACA CAC ACA CAC ACA A-3'	210

Tabelle 2.8: Zusammensetzung eines Ansatzes für eine Real-Time-PCR

KOMPONENTE	KONZENTRATION
PCR-Puffer	5µl
SybrGreen	1x
MgCl ₂	2 - 5 mM
dNTPs	je 0,2 mM
PlatinumTaq	1 U
Primer	0,1 - 0,3 µM
Template-cDNA	1 µl
Kalibrierlösung	10 nM
H ₂ O	auf 50µl aufgefüllt

Verdünnungsfaktor aufgetragen und eine Regressionsgerade durch die so ermittelten Punkte gelegt. Aus dem Anstieg dieser Geraden läßt sich durch

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{Anstieg}}}$$

die Effizienz der PCR-Reaktion ermitteln (230). Eine Effizienz größer 1,90 bzw. 90% wurde als Ausreichend für die Durchführung von Real-Time-PCRs erachtet.

2.8.4 Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Alle Pipettierschritte für die PCR wurden im Eisbad durchgeführt. Weiterhin wurden alle Real-Time-PCRs mindestens dreifach durchgeführt, wobei unterschiedliche cDNAs der gleichen RNA-Proben zum Einsatz kamen. Die eingesetzte PlatinumTaq-Polymerase ist Antikörper-inhibiert und wird erst durch den Erhitzungsschritt zu Beginn der PCR aktiviert. Als Sonde zur Detektion der PCR-Produkte wurde SybrGreen I verwendet. Dabei handelt es sich um ein interkalierendes Agens, welches gebunden an doppelsträngige DNA eine weit höhere Fluoreszenz aufweist als ungebunden. Neben den geringeren Kosten hat diese Methode gegenüber spezifischen Sonden den Vorteil einer höheren Sensitivität. Darüberhinaus ist es anhand der anschließenden Schmelzkurve möglich, auch unspezifische PCR-Produkte zu erkennen, die womöglich einen Einfluß auf die PCR-Effizienz haben. Als Housekeeping-Gen diente, wie oben erwähnt 1A. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Tabelle 2.8 gibt die Endkonzentrationen der PCR-Komponenten wieder.

Die Verwendung der immer gleichen Parameter beim Primerdesign (siehe Abschnitt 2.8.1 auf Seite 42) diente auch dazu, daß die verschiedenen PCRs gleichzeitig und mit den gleichen Temperaturschritten durchgeführt werden konnten. Das PCR-Programm bestand daher in allen Fällen aus den gleichen drei Schritten, welche 45 mal wiederholt wurden:

1. Denaturierung: 5 s bei 95°C
2. Anlagerung: 10 s bei 60°C
3. Elongation: 60s bei 72°C

Aufgrund des Einsatzes einer antikörperinhibierten Taq-Polymerase (PlatinumTaq) wurde die Reaktion erst durch den ersten Erhitzungsschritt auf 95°C, was zum Abdiffundieren der Antikörper führt, gestartet. Dies gewährleistet ein wesentlich genaueres Meßergebnis.

2.8.5 Auswertung der Real-Time-PCR

Abbildung 2.1 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer typischen Real-Time-PCR, wie es sich auf dem Computermonitor darstellt. Auf der Abszisse sind die PCR-Zyklen aufgetragen und die Ordinate zeigt die Fluoreszenz in relativen Fluoreszenzeinheiten (relative fluorescence units, RFU)

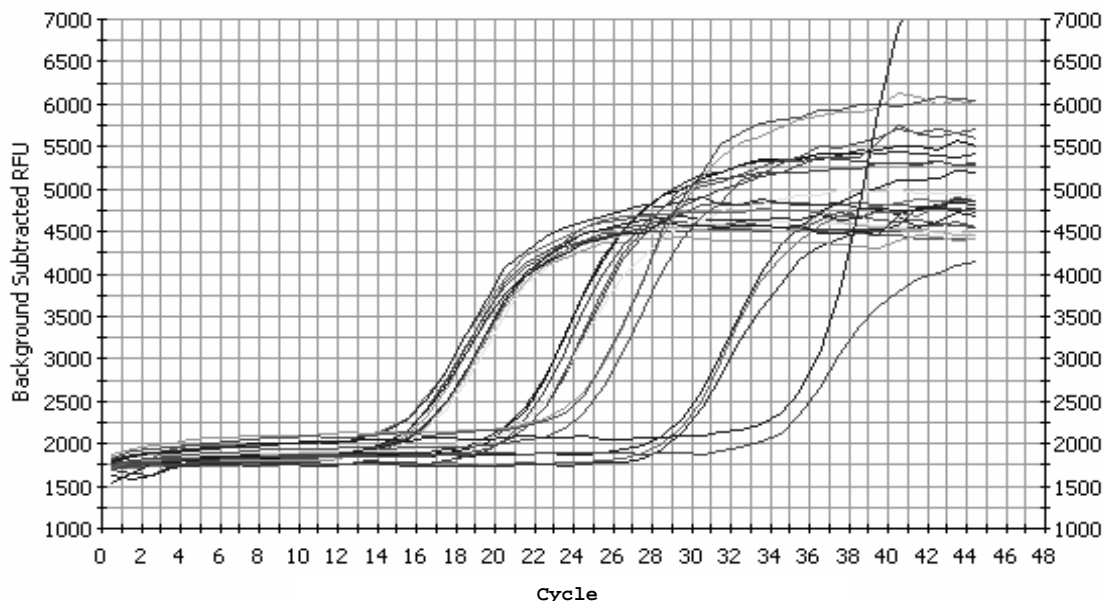


Abbildung 2.1: Ergebnis eines Laufs einer Real-Time-PCR

Zur Bestimmung des Zeitpunktes des Erreichen eines bestimmten Schwellenwertes C_T müssen zunächst von allen Kurven die Höhe ihrer Grundlinie, d.h. des Bereichs, in dem sich die Fluoreszenz nur um nicht detektierbare Beträge ändert, subtrahiert werden. Der Schwellenwert wird dann innerhalb des Bereichs, in dem sich die Fluoreszenz der Proben exponentiell ändert, vom Programm automatisch nach folgender Formel berechnet:

$$C_T = 10 * S_{DGrundlinie}$$

Dabei ist $S_{DGrundlinie}$ die Standardabweichung aller Meßwerte auf der Grundlinie. Trotzdem war es meist nötig, den Schwellenwert von Hand anzupassen. Dafür stand eine halblogarithmische Darstellung der Kurven zur Verfügung. Hier ist der Bereich des exponentiellen Anstiegs der Meßwerte als linearer Anstieg zu erkennen. Der C_T wurde ungefähr in die Mitte dieses Bereichs gelegt. Abbildung 2.2 auf Seite 47 zeigt das Monitorbild nach Durchführung dieser beiden Schritte und Rückkehr von der halblogarithmischen in die lineare Darstellung. Der Schnittpunkt aller Kurven mit C_T wird vom Programm automatisch berechnet.

Die weitere Auswertung erfolgte mittels Tabellenkalkulation. Nach Ausschluß offensichtlicher Ausreißer wurde ein Mittelwert der C_T -Werte der Triplikate gebildet. Die relativen

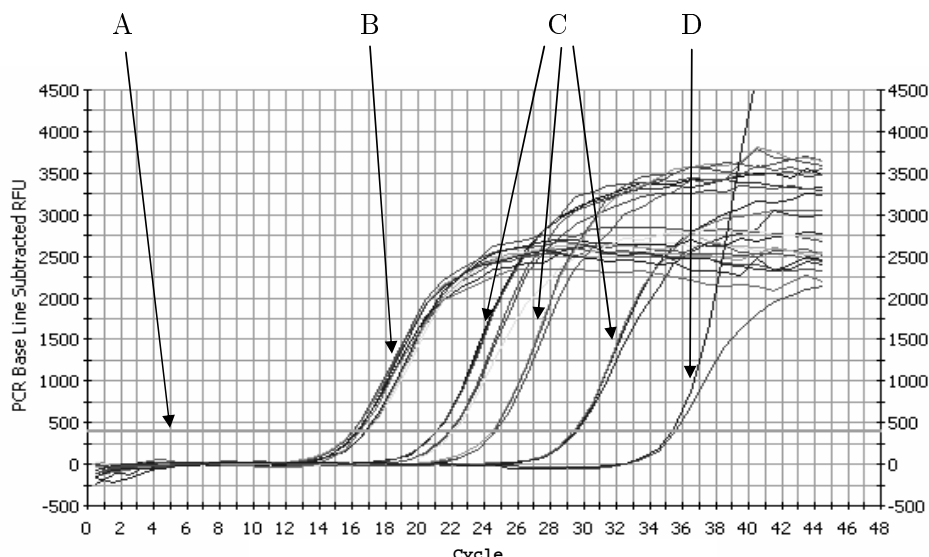


Abbildung 2.2: Real-Time-PCR nach Subtraktion der Grundlinie und Einstellung des Schwellenwerts C_T (A). B: PCR-Kurven des Housekeeping-Gens, C: PCR-Kurven des regulierten Zielgens, D: PCR-Kurven der Negativkontrollen von Housekeeping-Gen und Zielgen

Häufigkeiten der mRNA-Spezies wurden daraufhin mit Hilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Gleichung dargestellt, wobei eine optimale PCR-Effizienz (Verdoppelung pro Zyklus) angenommen wird (230):

$$R = 2^{\Delta C_{T\text{Zielgen}} - \Delta C_{T\text{Housekeeping-Gen}}}$$

Dabei ist

$$\Delta C_{T\text{Zielgen}} = C_{T\text{Zielgen(Kontrolle)}} - C_{T\text{Zielgen(Probe)}}$$

und

$$\Delta C_{T\text{Housekeeping-Gen}} = C_{T\text{Housekeeping-Gen(Kontrolle)}} - C_{T\text{Housekeeping-Gen(Probe)}}$$

Die Kontrolle ist in allen Fällen die unbehandelte Probe. R ist die relative Expression des Zielgens in der Kontrolle im Vergleich zur Expression dieses Gens in der Kontrolle.

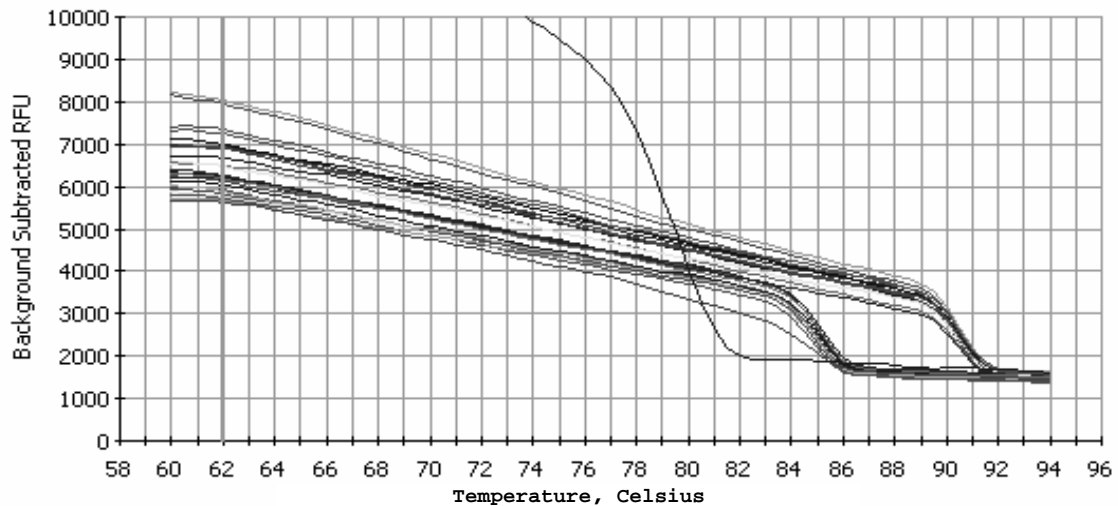
2.8.6 Ermittlung der Schmelzkurve der PCR-Produkte

An die Real-Time-PCR schloß sich in jedem Fall automatisch die Erstellung einer Schmelzkurve der PCR-Produkte an, welche durch die Detektion der Fluoreszenz von SybrGreen I analog zur PCR auf einem Monitor dargestellt werden konnte. Der Schmelzpunkt ist für jedes PCR-Produkt spezifisch, sodaß die Erstellung einer Schmelzkurve die aufwendige Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese für alle erhaltenen PCR-Produkte entfällt.

Hierfür wurde die Temperatur in 0,5°C-Schritten von 60°C auf 95°C erhöht. Jede Temperaturstufe wurde 7 s beibehalten. Dabei wurde die Intensität der Fluoreszenz bei 490 nm gemessen. Die Fluoreszenz-Intensität von an doppelsträngige DNA gebundenem Sybr-Green I nimmt mit steigender Temperatur ab. Wird die Schmelztemperatur eines PCR-

Produktes erreicht, findet durch die Freisetzung von SybrGreen 1 ein wesentlich stärkerer Abfall der Fluoreszenz-Intensität statt. Die Darstellung der 1. Ableitung der so entstandenen Schmelzkurve macht einen stärkeren Abfall der Fluoreszenz als Peak sichtbar (Abb. 2.3).

A



B

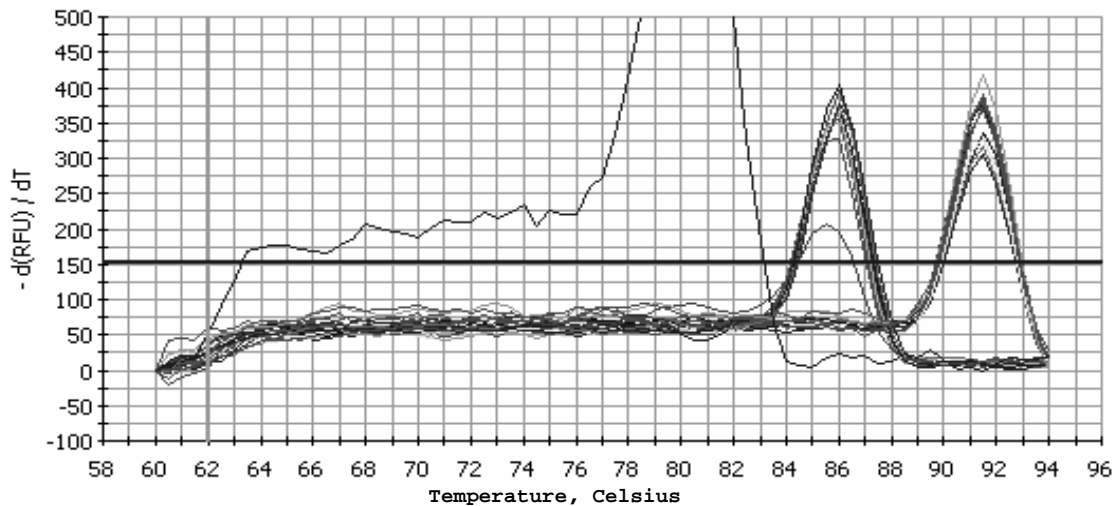


Abbildung 2.3: **A** Schmelzkurven von Housekeeping-Gen und Zielgen mehrerer Proben, sowie je einer Negativkontrolle; **B** Darstellung der 1. Ableitung dieser Kurven zur Verdeutlichung der Schmelzpunkte der Kurven

2.9 Statistische Auswertung

Die Real-Time-PCR-Experimente wurden mindestens drei mal mit mindestens zwei unabhängig synthetisierten cDNAs der gleichen RNA-Proben durchgeführt. Aus den so gewonnenen Meßwerten wurden Mittelwerte gebildet und die Standardabweichung berechnet. Mit Hilfe des Student's t-Test wurde die Wahrscheinlichkeit einer Änderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, deren Expressionsrate als 1 definiert war, ermittelt. Die Nullhypothese $H_0 : \mu = \mu_0$ besagt, daß sich die Expression des Zielgens in der untersuchten Probe nicht von der in der Kontrolle unterscheidet. Die Alternativhypothese besagte, daß sich die Expression unterscheidet. Dabei wurde keine Annahme über die Richtung der Änderung der Genexpression gemacht: $H_A : \mu \neq \mu_0$. Die Wahrscheinlichkeit P_0 für die Annahme der Nullhypothese wurde mittels Student's t-Test für den Vergleich eines Mittelwertes einer Normalverteilung mit einer Konstanten ermittelt. Analog wurde die Wahrscheinlichkeit P_F für die Annahme der Nullhypothese beim Vergleich der Expression eines Zielgens zwischen mit und ohne Fulvestrant behandelten Gruppen mit dem Student's t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte mit Normalverteilung vorgenommen. Signifikanz wurde angenommen, falls $P_0 \leq 0,05$ bzw. $P_F \leq 0,05$ ist.

Für den Proliferationstest wurde ebenfalls ein Student's t-Test für den Vergleich zweier Mittelwerte mit Normalverteilung durchgeführt. Auch hier wurde Signifikanz für $P \leq 0,05$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 *in vitro*-Tests mit 7OPN

Neben einem *in vitro*-Test mit stabil transfizierten Hefezellen, der keine östrogene Wirkung von 7OPN zeigte (Daten nicht gezeigt), wurde 7OPN in stabil mit einem ERE-Luziferase-Konstrukt transfizierten MVLN-Zellen sowohl auf eine mögliche östrogene wie auch auf antiöstrogene Wirkung getestet.

Wie man auf Abb. 3.1 A auf Seite 52 erkennen kann, führt eine Behandlung der MVLN-Zellen mit 10^{-8} M E2 zu einer fast 3-fach erhöhten Lumineszenz aufgrund der Aktivität des Luziferase-Reportertgens im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle. Dagegen führte die 10^{-8} M und 10^{-7} M 7OPN-Konzentration zu einer zu einer signifikanten Verringerung der Lumineszenz leicht unter das basale Niveau. Erst in höheren Konzentrationen von 10^{-6} M und 10^{-5} M führt 7OPN zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle erhöhten Luziferase-Aktivität. Diese ist durch gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant inhibierbar.

Abb. 3.1 B zeigt, daß 7OPN in den Konzentrationen 10^{-8} M und 10^{-7} M die durch E2 hervorgerufene Stimulation der Luziferase-Aktivität der MVLN-Zellen signifikant inhibiert, wenngleich weit weniger stark wie $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant. Höhere Konzentrationen haben keinen Effekt auf die E2-induzierte Luziferase-Aktivität.

3.2 Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVECs)

3.2.1 Proliferationstests

Zur Bestimmung des angiogenen Potentials der Testsubstanzen wurden mit isolierten HUVECs mehrere Proliferationstests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2, S. 53 dargestellt.

Während für die Versuche A und B Zellen aus unterschiedlichen Nabelschnüren verwendet wurden, stellen die Versuche C und D zwei Messungen, die mit Zellen der gleichen Nabelschnur durchgeführt wurden dar. Da sich die Ergebnisse der einzelnen Versuche teils stark unterscheiden, wurden sie nicht zu einem Gesamtergebnis zusammengefaßt, sondern werden hier einzeln widergegeben.

Zwar proliferierten die Zellen im Versuch A (Abb. 3.2 A) erwartungsgemäß recht gut, ein deutlicher Einfluß von E2, der Testsubstanzen iCR, 6DMAN und 8PN, sowie deren Kombination mit E2 und Fulvestrant auf die Proliferation der Zellen war jedoch trotz der langen Inkubationszeit von 6 Tagen nicht erkennbar.

Im Versuch B (Abb. 3.2 B) ist ebenfalls keine deutliche proliferationsfördernde Wirkung von E2 zu beobachten. Auch iCR, 6DMAN und 8PN hatten keinen Einfluß auf die Proliferation der HUVECs. Die kombinierte Behandlung mit E2, iCR und 6DMAN bewirkte jedoch eine signifikante Inhibierung der Proliferation. Bei der Kombination 8PN und Fulvestrant war dieser Effekt nur äußerst gering ausgeprägt und die Ergebnisse waren

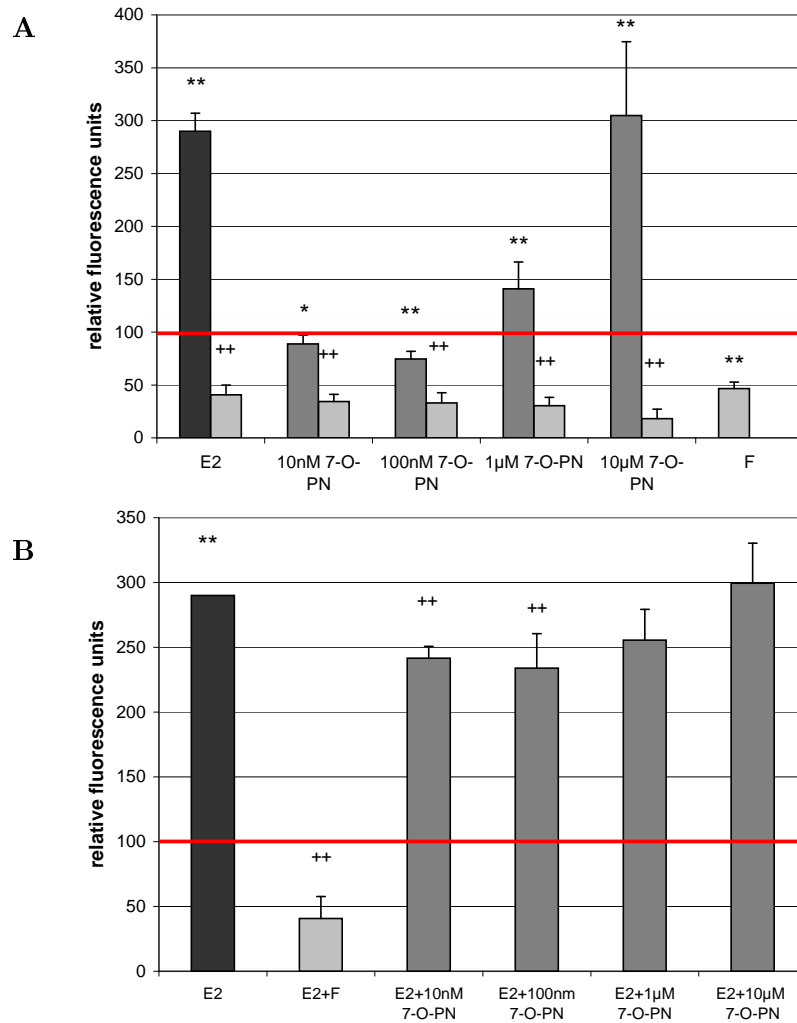


Abbildung 3.1: Luziferase-Test mit 7OPN in MVLN-Zellen. **A** Vergleich der konzentrationsabhängigen ER-Aktivierung von 7OPN zur wirksamsten E2-Konzentration (10^{-8} M) und zur unbehandelten Kontrolle (=100) und gleichzeitige Behandlung mit $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant (F) (helle Balken). * ($P \leq 0,05$) bzw. ** ($P \leq 0,01$) zeigt einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle an, + ($P \leq 0,05$) bzw. ++ ($P \leq 0,01$) kennzeichnet einen signifikanten Unterschied in der Luziferase-Aktivität zwischen einer einzelnen Behandlung und der gleichzeitigen Behandlung mit Fulvestrant. **B** Test auf antiöstrogene Wirkung von 7OPN durch gleichzeitige Behandlung von 10^{-8} M E2 mit 7OPN im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit 10^{-8} M E2 und im Vergleich zur Wirkung von $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant (F) in Kombination mit der gleichen E2-Konzentration (unbehandelt=100). + ($P \leq 0,05$) bzw. ++ ($P \leq 0,01$) kennzeichnet hier einen signifikanten Unterschied in der Luziferase-Aktivität zur E2-behandelten Positivkontrolle

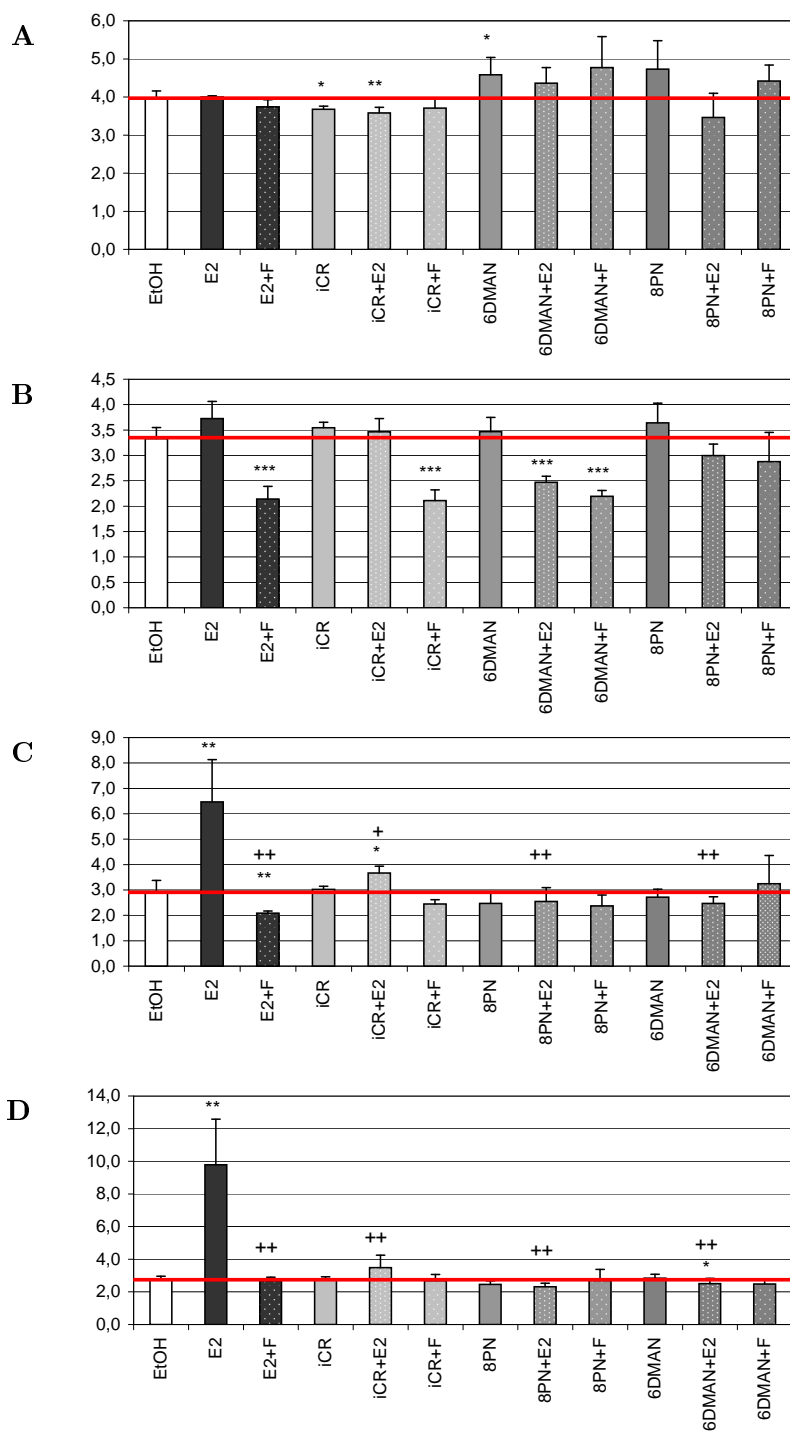


Abbildung 3.2: Proliferationstests mit HUVECs über 6 Tage. Die Versuche C und D wurden mit Zellen der selben Nabelschnur durchgeführt, während für die Versuche A und B die Zellen unterschiedlicher Nabelschnüre eingesetzt wurden. Alle Angaben in mg Protein/ml Testlösung. Folgende Endkonzentrationen wurden verwendet: 10^{-8} M E2, 10^{-6} M 6DMAN, 10^{-6} M 8PN, 10 μ g/ml iCR und $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant (F). * ($P \leq 0.05$), ** ($P \leq 0.01$) und *** ($P \leq 0.001$)) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle (EtOH) an.

statistisch nicht signifikant. Ebenfalls eine deutlich proliferationshemmende Wirkung auf die Endothelzellen zeigte in diesem Versuch die Kombination von 6DMAN und E2.

Die Ergebnisse der beiden Versuche, welche mit Zellen der gleichen Nabelschnur durchgeführt wurden (Abb. 3.2 C und D) stimmen weitestgehend überein. Hier war ein deutlicher proliferationsfördernder Effekt von E2 zu beobachten. Der Meßwert betrug das 2- bis 3-fache der Ethanol-behandelten Negativkontrolle. Die zusätzliche Behandlung mit Fulvestrant konnte den Effekt vollständig inhibieren. Im Versuch C wurde sogar eine Hemmung der Proliferation unter das Niveau der Negativkontrolle gemessen. Interessanterweise konnten die beiden Naringenine den proliferationsfördernden Effekt von E2 komplett hemmen. Nur in Kombination mit iCR ist noch ein geringer Effekt von E2 auf die Proliferation der HUVECs erkennbar.

3.2.2 Differenzierungstests

Dieser Test gibt zusätzlichen Aufschluß über die angiogene Wirkung der Testsubstanzen. Bei dem hier untersuchten Teilaspekt der Angiogenese handelt es sich um die Bildung endothelialer Tubuli. Abbildung 3.3 zeigt deutlich, daß die HUVECs auf Matrigel zur Ausbildung von netzartigen Röhrenstrukturen neigen. Dieser Effekt ist abhängig von der eingesetzten E2-Konzentration. Zwar sind die Strukturen auch in der EtOH-behandelten Negativkontrolle erkennbar, allerdings ist das Netz dort sehr weitmaschig und unvollständig. Eine 10^{-9} molare E2-Konzentration bewirkt kaum einen erkennbaren Unterschied zur Negativkontrolle aber bei einer E2-Konzentration von 10^{-8} M ist das Netz deutlich engmaschiger ausgeprägt. Die gleichzeitige Behandlung mit dieser E2-Konzentration und dem Antiöstrogen Fulvestrant hebt den Effekt wieder auf. In diesem Fall sind viele der Maschen wieder unvollständig. Auch bei einer noch höheren E2-Konzentration von 10^{-7} M ist noch ein Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar, welcher jedoch nicht so ausgeprägt ist wie bei der wirksamsten E2-Konzentration von 10^{-8} M.

Die Ergebnisse für den Differenzierungstest bei Behandlung mit 6DMAN sind nicht so eindeutig, wie bei Behandlung mit E2 (siehe Abbildung 3.4. Zwar sind im Vergleich zur Negativkontrolle in den mit 6DMAN behandelten Wells mehr netzartige Röhrenstrukturen ausgebildet, eine Konzentrationsabhängigkeit ist jedoch nicht nachweisbar. Darüber hinaus ist bei der gleichzeitigen Behandlung mit 10^{-6} M 6DMAN und 10^{-8} M E2 eher eine geringere Ausbildung der Strukturen sichtbar. Die gleichzeitige Behandlung mit 10^{-6} M 6DMAN und $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant führt zu einem der Negativkontrolle vergleichbaren Bild.

In Abbildung 3.5 sind die Ergebnisse des Differenzierungstests nach Behandlung mit 8PN im Vergleich zur Positiv- und zur Negativkontrolle dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, daß 8PN zu einer starken Differenzierung der Zellen im Vergleich zur unbehandelten Negativkontrolle führt. Dieser Effekt scheint konzentrationsabhängig zu sein, da eine 8PN-Konzentration von 10^{-6} M zu einer noch stärkeren Ausprägung der netzartigen Strukturen führt als das 10^{-7} M 8PN. 10^{-6} M 8PN scheint die Differenzierung der HUVECs auch stärker zu stimulieren als 10^{-8} M E2. Auch die kombinierte Behandlung mit 10^{-6} M 8PN und 10^{-8} M E2 führt zu einer starken Differenzierung der HUVECs, vergleichbar mit der alleinigen Behandlung mit 10^{-6} M 8PN. Die zusätzliche Behandlung mit Fulvestrant blockiert den differentiationsfördernden Effekt von 8PN.

Abbildung 3.6 zeigt die Ergebnisse des Differenzierungstests nach Behandlung mit iCR

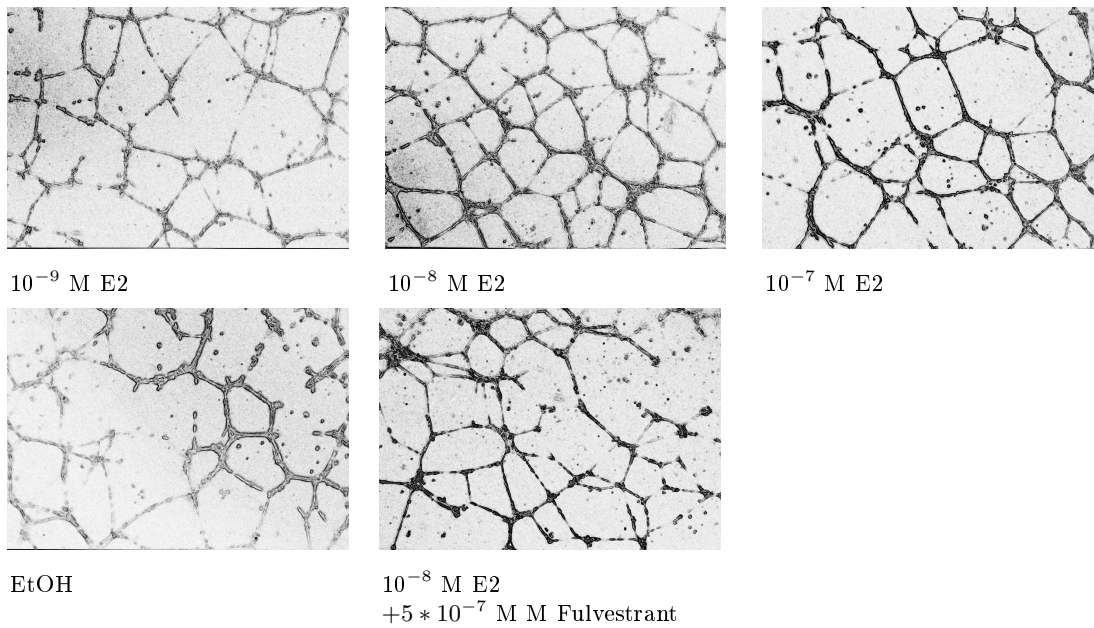


Abbildung 3.3: Matrigel-Assay mit HUVECs: Konzentrationsabhängige Wirkung von E2 auf die Formierung netzförmiger Röhrenstrukturen im Vergleich zu mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen und kombinierte Wirkung der wirksamsten E2-Konzentration mit dem Antiöstrogen Fulvestrant (40-fache Vergrößerung)

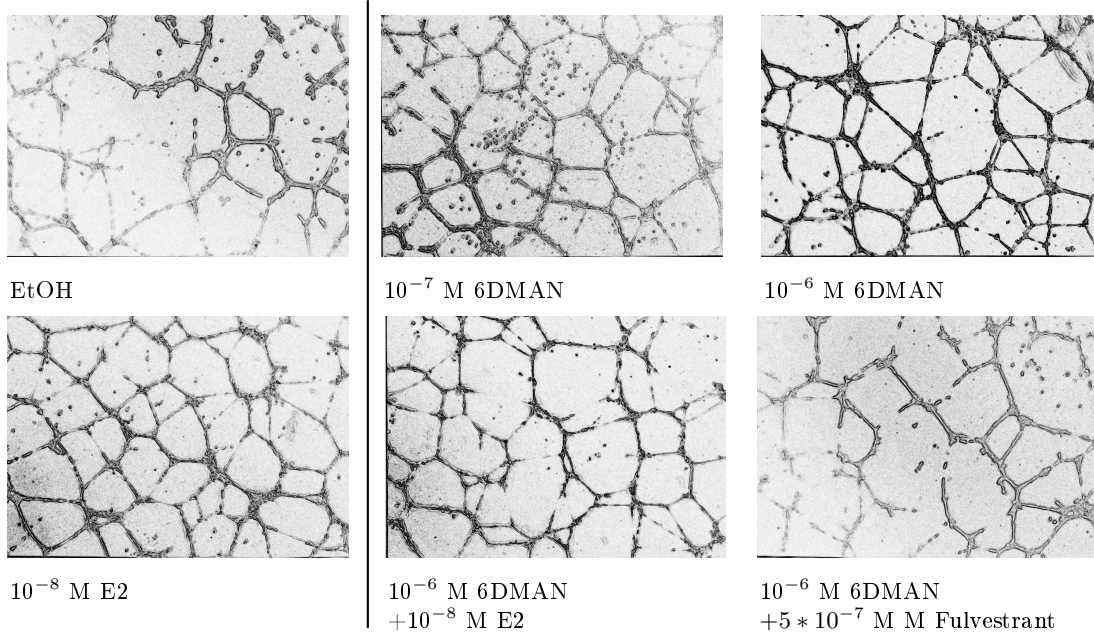


Abbildung 3.4: Matrigel-Assay mit HUVECs: Konzentrationsabhängige Wirkung von 6DMAN auf die Formierung netzförmiger Röhrenstrukturen im Vergleich zu mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen und kombinierte Wirkung der wirksamsten 6DMAN-Konzentration mit Östradiol und dem Antiöstrogen Fulvestrant (40-fache Vergrößerung)

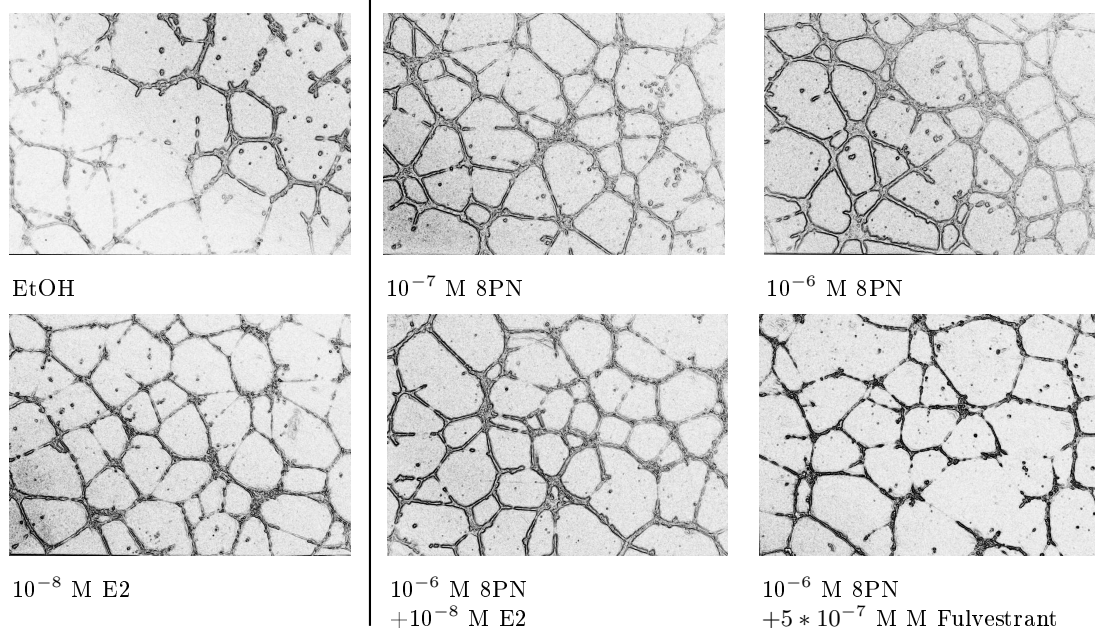


Abbildung 3.5: Matrigel-Assay mit HUVECs: Konzentrationsabhängige Wirkung von 8PN auf die Formierung netzförmiger Röhrenstrukturen im Vergleich zu mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen und kombinierte Wirkung der wirksamsten 8PN-Konzentration mit Östradiol und dem Antiöstrogen Fulvestrant (40-fache Vergrößerung)

im Vergleich zur Positiv- und Negativkontrolle. Während die Behandlung mit 1 µg/ml iCR zu einer leichten Stimulation der Differenzierung der HUVECs führt, ist bei Behandlung mit 10 µg/ml iCR eine deutlich geringere Ausprägung der netzartigen Röhrenstrukturen im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar. Die gleichzeitige mit 10^{-8} M E2 und 10 µg/ml iCR bewirkt eine geringere Differenzierung der Zellen als dies bei alleiniger Behandlung mit E2 der Fall ist. Auch die gleichzeitige Behandlung mit 10 µg/ml iCR und $5 \cdot 10^{-7}$ M Fulvestrant führt zu einer sehr geringen Ausprägung der netzartigen Struktur.

3.3 Tierversuch 1 über drei Tage in Wistar-Ratten

In diesem Experiment wurde die zeitabhängige Wirkung der Flavanone 8PN und 6DMAN auf den Uterus und das Gefäßsystem der Ratten im Vergleich zu E2 untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung von 7OPN über einen Behandlungszeitraum von 72 h getestet. Dabei wurde sowohl das Uterusgewicht, als auch die Expression E2-regulierter Gene in Uterus und Vena cava gemessen.

3.3.1 Uterotropher Test

Ein klassischer Endpunkt östrogenen Wirkung ist das Uterusgewicht ovariectomierter Ratten. Wie in Abb. 3.7, S. 57 deutlich wird, nimmt dieses nach E2-Behandlung auf tendentiell zeitabhängige Art und Weise zu, während die Kontrolltiere keine Veränderung des Uterusgewichts zeigen. Auch 6DMAN zeigt keinen uterotrophen Effekt. Dagegen bewirkt 8PN

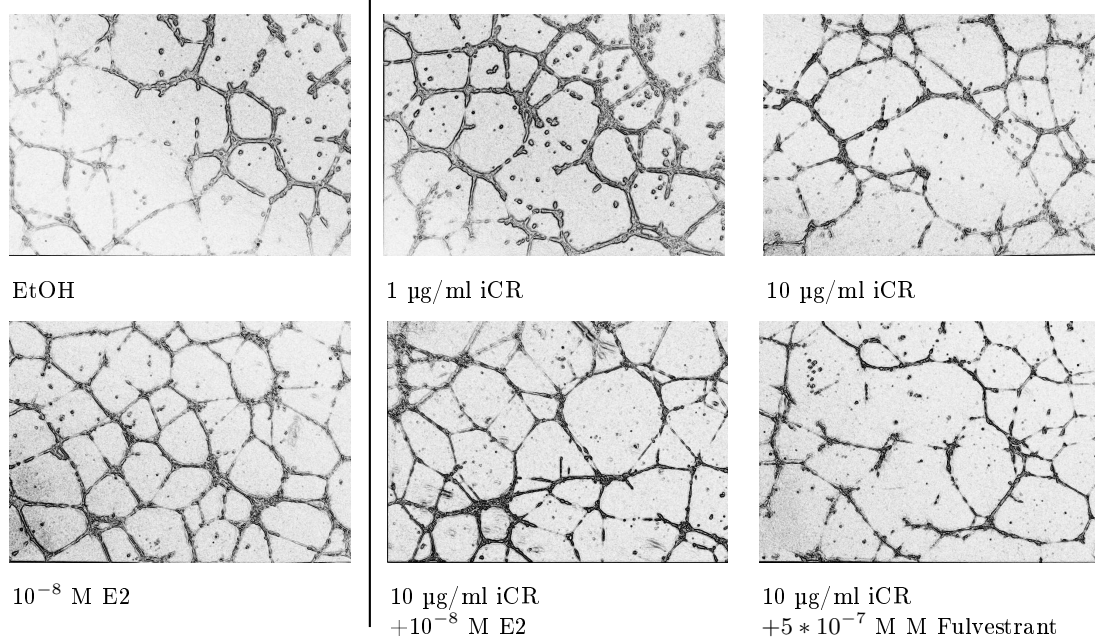


Abbildung 3.6: Matrigel-Assay mit HUVECs: Konzentrationsabhängige Wirkung von iCR auf die Formierung netzförmiger Röhrenstrukturen im Vergleich zu mit der Trägersubstanz Ethanol behandelten Zellen und kombinierte Wirkung der wirksamsten iCR-Konzentration mit Östradiol und dem Antiöstrogen Fulvestrant (40-fache Vergrößerung)

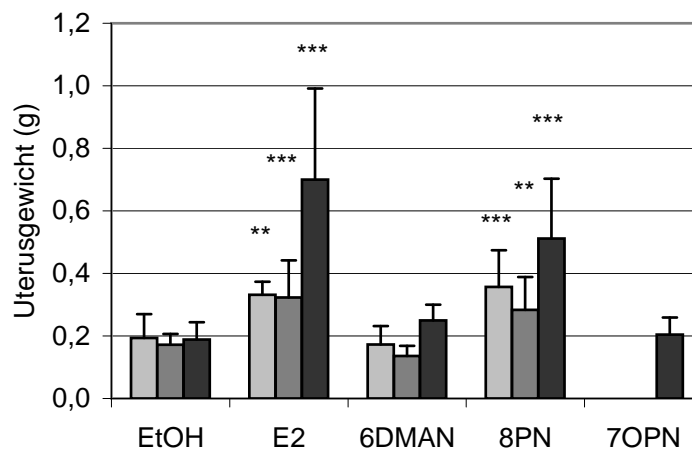


Abbildung 3.7: Mittlere Uterusgewichte der Wistarratten nach 7, 24 und 72-stündiger Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN und 72-stündiger Behandlung mit 7OPN im Vergleich zu nur mit der Trägersubstanz behandelten Kontrolltieren. * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

einen ähnlichen Effekt, wie E2. Man kann einen deutlichen Anstieg des Uterusgewichts nach 8PN-Behandlung erkennen, der im zeitlichen Verlauf zunimmt, jedoch insgesamt, trotz höherer eingesetzter Dosis, etwas schwächer ausgeprägt ist, als nach E2-Behandlung.

3.3.2 Genexpression im Uterus

Zeitabhängige uterine Genexpression nach Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN

Aufgrund der Vielzahl der untersuchten Gene wurde die Darstellung der Expressionsmuster auf zwei Abbildungen verteilt. Abbildung 3.8 auf Seite 59 zeigt die relative Expression der Östrogenrezeptoren ER α und ER β , sowie der ebenfalls E2-regulierten Gene C3, Clu, PR und COX2.

Auch in diesen Tieren konnte die Expression beider Isoformen des Östrogenrezeptors nachgewiesen werden, wobei ER α wesentlich stärker exprimiert ist als ER β . Die erwartungsgemäße Herunterregulation von **ER α** im Uterus erfolgt relativ langsam. Obwohl auch schon nach 24 h ein abnehmender Trend erkennbar ist, ist erst nach 72-stündiger Behandlung mit E2 eine signifikante Abnahme der ER α -mRNA-Expression meßbar. Die ER α -Expression liegt nach 72-stündiger E2-Behandlung bei 40% der Expression in den Uteri der nur mit der Trägersubstanz behandelten Kontrolltiere.

Nach Behandlung mit 6DMAN ist ein ähnliches Expressionsmuster erkennbar. Wiederum ist trotz bereits nach 24 h erkennbarer Tendenz erst nach 72 h eine signifikante Verringerung der ER α -mRNA-Expression erkennbar. Allerdings fällt trotz 1500-fach höherer Dosierung die Verringerung der Expression der mRNA von ER α wesentlich geringer aus. Sie liegt nach 72 h 6DMAN-Behandlung immer noch bei ca. 65% der Expressionsrate in den Kontrolltieren.

Auch die Behandlung mit 8PN führt zu einer deutlich verringerten Expression der ER α -mRNA. Das uterine ER α -Expressionsmuster entspricht weitestgehend dem der Positivkontrolle. Nach 72 h Behandlung mit 8PN sinkt die mRNA-Expression von ER α auf ca. 40% des Wertes der Negativkontrolle.

Etwas anders sieht der zeitliche Verlauf der Regulation Expression der **ER β** -mRNA nach der Behandlung mit den Testsubstanzen aus. Die Behandlung mit E2 führt zu einer sehr raschen und starken Verringerung der uterinen ER β -mRNA-Expression. Bereits nach 7 h ist eine Verringerung des Expressionsniveaus auf ca. 10% des Wertes in den Uteri der Kontrolltiere feststellbar. Nach 24 h fällt dieser Wert noch weiter auf ca. 3% des Ausgangswertes, um nach 72h wieder soweit anzusteigen, daß aufgrund der großen Standardabweichung, welche der insgesamt geringen Expressionsrate von ER β geschuldet ist, keine signifikante Herunterregulation der ER β -mRNA mehr feststellbar ist.

Die Behandlung mit 6DMAN führt ebenfalls zu einer sehr raschen Verringerung der uterinen mRNA-Expression von ER β . Allerdings geht die Expressionsrate nach 7-stündiger Behandlung nur auf ca. 35% zurück um dann bereits nach 24 h wieder leicht auf ca. 50% der Expressionsrate der Negativkontrolle anzusteigen. Nach einer Behandlungszeit von 72 h ist keine verringerte mRNA-Expression von ER β mehr feststellbar.

Das ER β -Expressionsmuster nach Behandlung mit 8PN gleicht im Uterus wiederum weitestgehend dem nach der Behandlung mit E2. Die Expressionsrate sinkt nach einer Behandlungsdauer von 7 h auf ca. 20%. Nach 24 h beträgt sie sogar weniger als 10% der ER β -Expression in den Kontrolltieren. Nach 72-stündiger Behandlung mit 8PN ist

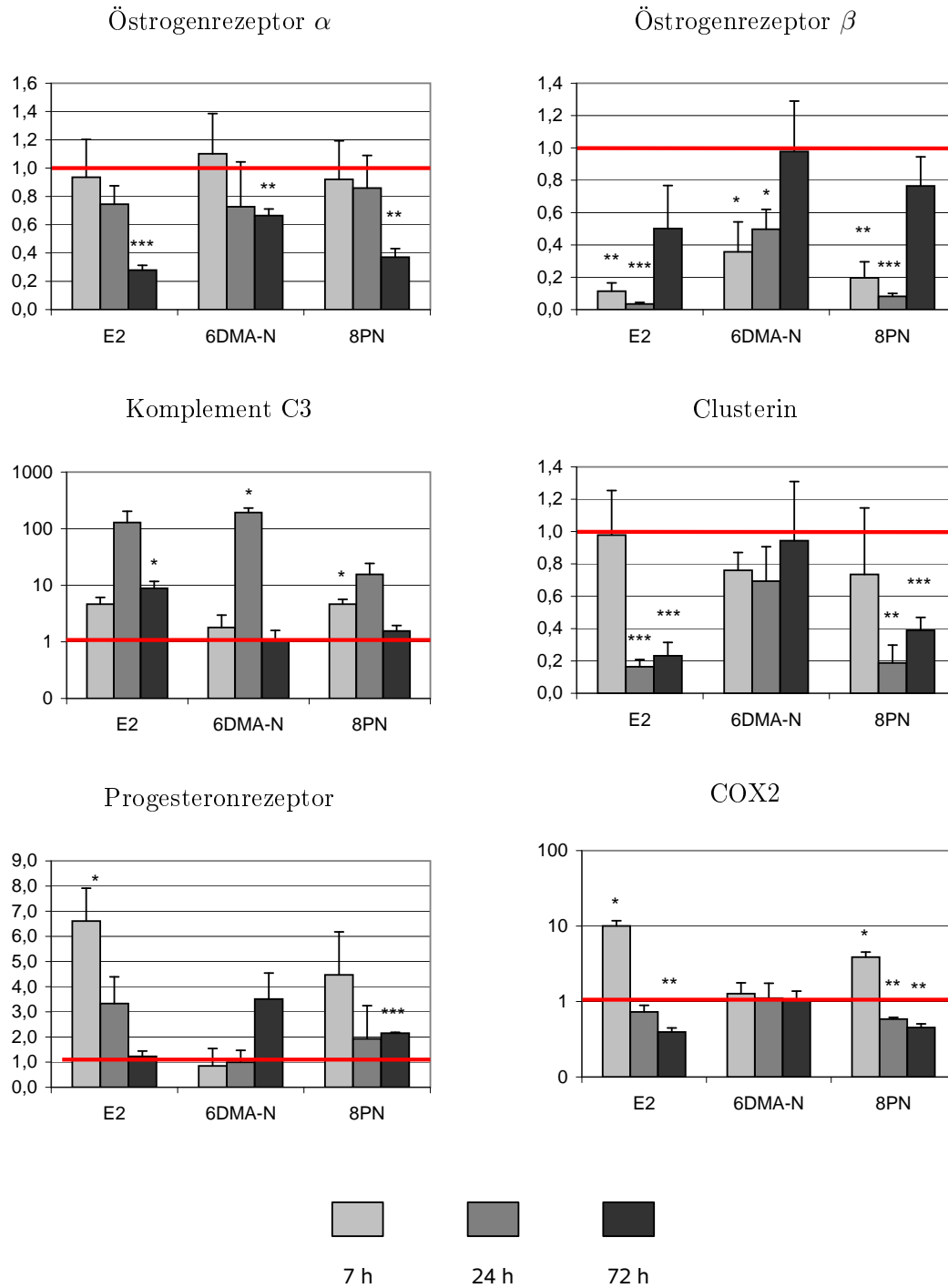


Abbildung 3.8: Zeitabhängige relative Expressionsrate der Gene $ER\alpha$, $ER\beta$, C3, Clu, PR und COX2 im Uterus von Wistar-Ratten nach Behandlung mit E2, 6DMA-N und 8PN über einen Zeitraum von 7 h, 24 h und 72 h (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

jedoch wiederum keine signifikante Herunterregulation der ER β -mRNA-Expression mehr nachweisbar.

Die Expressionsrate von **Komplement C3** wurde auch in diesem Experiment durch die Behandlung mit E2 stark nach oben reguliert. Obwohl auch schon 7 h nach der E2-Behandlung eine 5fache Hochregulation meßbar ist, ist der höchste Wert nach 24-stündiger Behandlung feststellbar. Die Expressionsrate der C3-mRNA im Uterus der Ratten liegt zu diesem Zeitpunkt 128-fach über der C3-Expressionsrate in den Kontrolltieren. Nach 72 h ist die uterine C3-Expression immer noch 9-fach erhöht im Vergleich zur Expression in den Kontrolltieren.

Auch die Behandlung mit 6DMAN führt zu einem starken Anstieg der uterinen C3-Expressionsrate. Signifikant wird dieser jedoch erst nach 24-stündiger Behandlungsdauer. Dann allerdings konnte eine ca. 200-fache Hochregulation festgestellt werden. Analog zum C3-Expressionsmuster in den E2-behandelten Tieren geht die Expressionsrate nach 72-stündiger 6DMAN-Behandlung wieder zurück. Es konnte kein Unterschied mehr zur uterinen C3-Expression in den Kontrolltieren festgestellt werden.

In den 8PN-behandelten Tieren ist ebenfalls ein starker Anstieg der C3-mRNA-Expression sowohl nach 7 h (5-fach) als auch nach 24 h (16-fach) Behandlung feststellbar. Nach 72-stündiger Behandlung liegt die uterine Expressionsrate der C3-mRNA wieder auf dem Niveau der Expression in den Uteri der Kontrolltiere.

Die uterine **Clusterin**-mRNA-Expression zeigt nach 24-stündiger sowie nach 72-stündiger E2-Behandlung eine charakteristische Herunterregulation. In beiden Fällen beträgt die Expressionsrate noch ca. 20% der Expression in der Negativkontrolle. In den Uteri der Tiere, welche für 7 Stunden mit E2 behandelt wurden war jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle keine veränderte Clusterin-Expression erkennbar.

Im Unterschied zu E2 verursacht die Behandlung mit 6DMAN keine signifikante Veränderung der Clusterin-mRNA-Expression im Uterus.

Die Behandlung mit 8PN führt nach 7 h zu keiner signifikanten Änderung der uterinen Clusterin-Expression. Nach 24-stündiger Behandlung mit 8PN ist die Expression der Clusterin-mRNA im Uterus jedoch auf 20% gesunken. Auch nach 72 h 8PN-Behandlung ist noch eine auf ca. 40% der Negativkontrolle verringerte Expression der Clusterin-mRNA feststellbar.

Erwartungsgemäß führt die Behandlung mit E2 zu einer kurzzeitigen Hochregulation der **Progesteronrezeptor**-mRNA-Expression. Nach 7-stündiger E2-Behandlung ist ein Anstieg der PR-Expression um fast 700% nachweisbar. Dieser Anstieg klingt jedoch offenbar rasch wieder ab. 24 h nach Behandlungsbeginn ergab der Mittelwert aller drei Messungen zwar immer noch eine dreifach höhere PR-mRNA-Expression als in den Uteri der unbehandelten Kontrolltiere. Allerdings ist dieser Unterschied aufgrund der hohen Standardabweichung nicht signifikant. Nach 72 h E2-Behandlung befindet sich die Expressionsrate der PR-mRNA schon wieder auf dem Niveau der Negativkontrolle.

Demgegenüber führt die Behandlung mit 6DMAN zu keiner signifikanten Änderung der mRNA-Expression des PR. Allerdings läßt der Meßwert der PR-Expression nach 72-stündiger 6DMAN-Behandlung eine Hochregulation auf ca. 300% des Wertes der Negativkontrolle vermuten.

Nach der Behandlung mit 8PN zeigt sich ein ähnlichen PR-Expressionsmuster wie nach der Behandlung mit E2. Allerdings führen die großen Standardabweichungen dazu, daß die einzelnen Meßwerte, abgesehen vom Wert nach 72-stündiger 8PN-Behandlung, keine

signifikante Änderung der Expressionsrate anzeigen. Trotzdem läßt sich, betrachtet man den gesamten Verlauf, tendenziell sagen, daß 8PN zu einem schnellen Anstieg der PR-mRNA-Expression mit einem gemessenen Maximum nach 7h führt. Dieser Wert liegt bei ca. dem vierfachen der Expressionsrate der Negativkontrolle. Danach fällt die uterine PR-Expressionsrate auf ca. das doppelte der PR-Expression in den Uteri der Kontrolltiere ab.

Bei einem weiteren im Uterus auf sein Expressionsmuster untersuchten Gen handelt es sich um **COX2**. Seine uterine mRNA-Expression wird in diesem Experiment nach Behandlung mit E2 bereits nach 7 h im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor 10 hochreguliert. Nach 24-stündiger Behandlungszeit mit E2 ist diese Hochregulation jedoch vollständig abgeklungen und nach 27-stündiger Behandlung mit E2 ist die uterine COX2-mRNA-Expression im Vergleich zur Expression in den Kontrolltieren signifikant auf das 0,4-fache herunterreguliert.

Die Behandlung mit 6DMAN ruft dagegen in diesem Experiment zu keinem Meßzeitpunkt eine Veränderung der COX2-Expression im Uterus hervor.

Eine 7-stündige Behandlung mit 8PN führt jedoch ebenfalls zu einer um den Faktor 4 erhöhten uterinen COX2-Expression. Aber bereits nach einer Behandlungszeit von 24 h ist im Vergleich zu den nur mit der Trägersubstanz behandelten Kontrolltieren eine auf 60% verringerte COX2-mRNA-Expression meßbar. Nach 72 h beläuft sich die mRNA-Expression von COX2 im Uterus nur noch auf 45% des Meßwertes der Negativkontrolle.

Die Expression der Proliferationsmarker KI67 und PCNA, sowie von VEGF und dessen östrogen reguliertem Rezeptor VEGFR2 ist in Abbildung 3.9 auf Seite 62 dargestellt.

Erwartungsgemäß wird die uterine Expression der mRNA des Proliferationsmarkers **KI67** durch die Behandlung mit E2 im Uterus hochreguliert, wenngleich dies erst nach 24 h deutlich wird. Zu diesem Zeitpunkt konnte eine im Vergleich zur Negativkontrolle 7-fach erhöhte KI67-Expression gemessen werden. Auch nach 72-stündiger Behandlung kann man sicher ebenfalls von einer erhöhten KI67-mRNA-Expression ausgehen, obwohl sich aus dem Meßergebnis kein mathematisch signifikanter Unterschied zur Expression in der Negativkontrolle ergibt.

Im Unterschied dazu bewirkt 6DMAN zu keinem Meßzeitpunkt eine Veränderung der KI67-Expression im Uterus im Vergleich zur Negativkontrolle.

Das sich nach Behandlung mit 8PN ergebende Expressionsmuster entspricht weitestgehend dem, welches nach Behandlung mit E2 gemessen wurde. Nach 7-stündiger 8PN-Behandlung ist noch kein Anstieg der KI67-mRNA-Expression meßbar. Nach 24 h wird ein Maximum erreicht. Auch in diesem Fall war die Expression nahezu um den Faktor 7 erhöht. Auch nach 72 h 8PN-Behandlung ist noch eine deutliche Tendenz zur Hochregulation um den Faktor 4 im Vergleich zur uterinen Expression in den Kontrolltieren erkennbar. Allerdings ist auch dieser Meßwert nicht signifikant.

Die uterine mRNA-Expression von **PCNA** ist nach Behandlung mit E2 ebenfalls erhöht. Schon nach 7-stündiger Behandlung steigt sie auf das 3,7-fache des Wertes in den Kontrolltieren an. Nach einer Behandlungszeit von 24 h wird sogar eine 4,8-fache Hochregulation der PCNA-mRNA-Expression erreicht. Nach 72 Stunden ist kein signifikanter Unterschied zwischen der mRNA-Expression von PCNA in den Uteri der behandelten Tiere und der Kontrolltiere mehr meßbar.

Auch bezüglich der PCNA-mRNA-Expression zeigt 6DMAN keine Wirkung auf den Uterus im Vergleich zu den Trägersubstanz-behandelten Kontrolltieren.

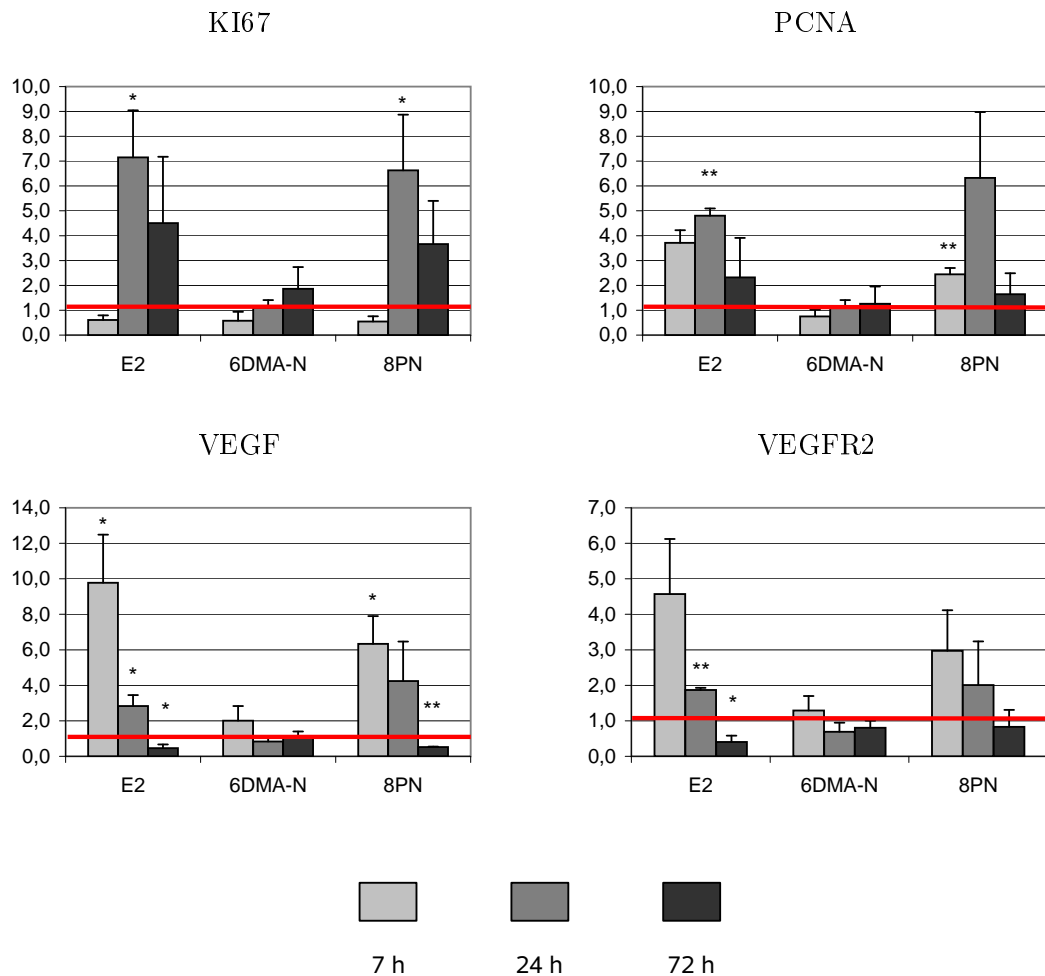


Abbildung 3.9: Zeitabhängige relative Expressionsrate der uterotrophieassoziierten Gene KI67, PCNA, VEGF und VEGFR2 im Uterus von Wistar-Ratten nach Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN über einen Zeitraum von 7 h, 24 h und 72 h (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

Die Behandlung mit 8PN führt wiederum schon nach 7h zu einem deutlich meßbaren Anstieg der PCNA-mRNA-Expression im Uterus im Vergleich zur Negativkontrolle.

Die uterine mRNA-Expression von **VEGF** ist nach E2-Behandlung zunächst deutlich hochreguliert. Bereits nach 7 h ist eine Zunahme auf das 10-fache der basalen Expression, wie sie in den Kontrolltieren gemessen wurde, nachweisbar. Nach einem Behandlungszeitraum von 24 h wurde jedoch nur noch eine Hochregulation auf das Dreifache des Wertes in den Uteri der Kontrolltiere festgestellt. Nach 72-stündiger Behandlung mit E2 wurde sogar eine signifikante Herunterregulation im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt.

6DMAN wiederum scheint zu keinem Zeitpunkt einen Einfluß auf die uterine VEGF-mRNA-Expression auszuüben.

Nach 7-stündiger Behandlung mit 8PN steigt die mRNA-Expression von VEGF auf das

6-fache. Nach 24-stündiger Behandlung scheint immer noch eine ca. 4-fache Hochregulation der VEGF-mRNA vorhanden zu sein. Ähnlich wie bei der Behandlung mit E2 kommt es jedoch nach einer 72-stündigen Behandlung mit 8PN zu einer signifikanten Herunterregulation der Expression der VEGF-mRNA auf ca. die Hälfte des Wertes in den Uteri der Kontrolltiere.

Die mRNA-Expression von **VEGFR2** ist im Uterus nach 7-stündiger E2-Behandlung ebenfalls stark hochreguliert. Im Vergleich zu den Trägersubstanz-behandelten Kontrolltieren konnte eine Hochregulation um das 4,5-fache gemessen werden. Nach 24 h ist nur noch eine Hochregulation um den Faktor 1,9 feststellbar und nach 72 h E2-Behandlung ist auch die mRNA-Expression von VEGFR2 auf das 0,4-fache des Wertes in den Uteri der Kontrolltiere herunterreguliert.

Auch auf die Expression dieses Gens hat 6DMAN offenbar im Uterus keinen Einfluß.

Die Ergebnisse der Messungen der VEGFR2-mRNA-Regulation nach Behandlung mit 8PN wiesen eine etwas stärkere Streuung auf. Die gemessenen Unterschiede in der Expression dieses Gens waren daher mathematisch nicht signifikant. Betrachtet man jedoch das Gesamtbild aller drei Meßzeitpunkte, kann man dennoch sagen, daß das Ergebnis qualitativ in etwa dem entspricht, was nach der Behandlung mit E2 gemessen wurde. Das heißt, man beobachtet eine schnelle, bereits nach 7 h sichtbare Hochregulation der VEGFR2-mRNA-Expression, welche nach 24 h bereits zurückgeht. Nach 72 h ist kein Unterschied zur Negativkontrolle mehr vorhanden. Ob es Analog zur VEGFR2-Expression nach E2-Behandlung auch nach 72-stündiger oder längerer Behandlungszeit mit 8PN zu einer Herunterregulation der mRNA-Expression von VEGFR2 kommt, ist nicht sicher.

Uterine Genexpression nach 72-stündiger Behandlung mit 7OPN

Eine Behandlung mit 7OPN wurde nur über den für uterotrophe Tests üblichen Zeitraum von 72 h durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit denen der Trägersubstanz-behandelten Kontrolltieren und mit der E2-behandelten Positivkontrolle verglichen. Abbildung 3.10 auf Seite 64 gibt einen Überblick über die Ergebnisse. Die Behandlung wurde im selben Experiment wie die der anderen 72 h behandelten Tiere durchgeführt. Die Werte der Gruppe „E2“ entsprechen daher den im vorherigen Abschnitt präsentierten Werten der gleichen Behandlungsgruppe.

Während E2 eine starke, für diesen Zeitpunkt aufgrund einer starken Streuung der Meßwerte jedoch nicht signifikante, Hochregulation der Proliferationsmarker **PCNA** und **KI67** bewirkt, konnte in den mit 7OPN behandelten Tiere für die mRNA-Expression PCNA und KI67 kein signifikanter Unterschied zur mit der Trägersubstanz behandelten Kontrollgruppe gemessen werden.

Die mRNA-Expression der im proliferierenden Endometrium stark exprimierten Gene **VEGF** und **VEGFR2** ist, wie auch am zeitlichen Verlauf (Abb. 3.9, S. 62) deutlich wird, nach 72-stündiger Behandlung mit E2 bereits wieder unter das Expressionsniveau der Negativkontrolle gefallen. Sie beträgt noch ca. das 0,5-fache der VEGF-Expression in den Uteri der Kontrolltiere. Ein Einfluß von 7OPN auf die mRNA-Expression von VEGF und VEGFR2 konnte jedoch nicht festgestellt werden.

Die uterine mRNA-Expression von **ER α** ist somit nach 72-stündiger Behandlungszeit, wie bereits im vorherigen Abschnitt besprochen, auf ca. 40% der basalen Expressionsrate reduziert. Dagegen übt 7OPN offenbar keinen Einfluß auf die ER α -mRNA-Expression aus.

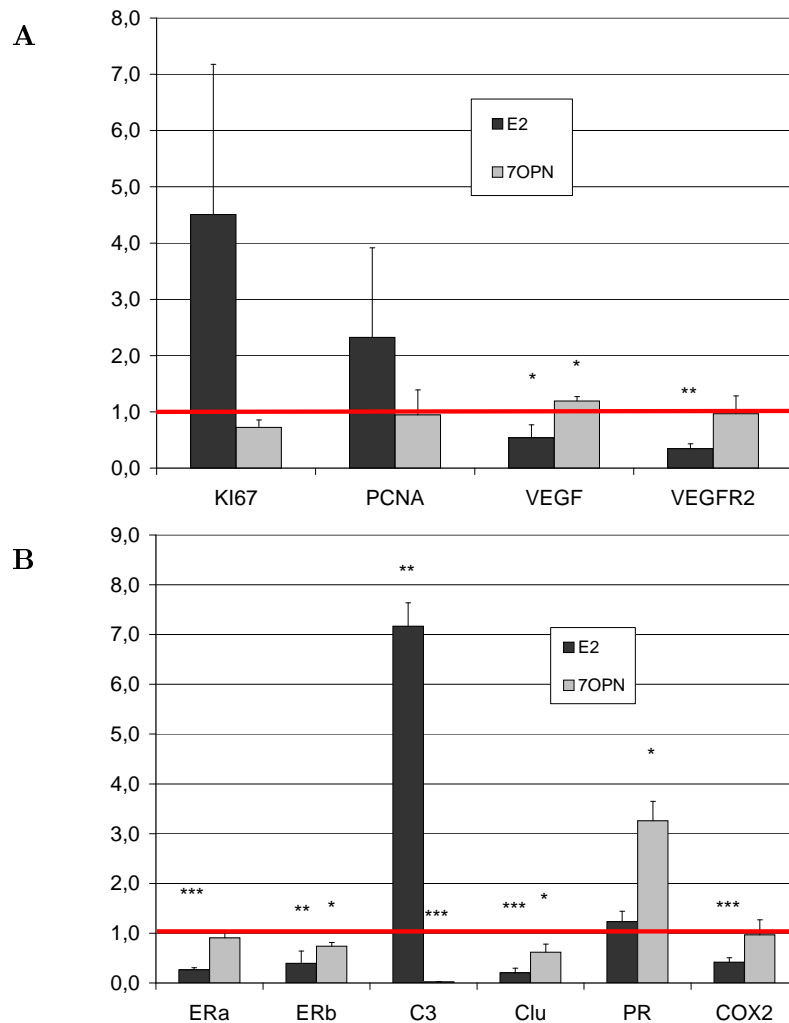


Abbildung 3.10: Relative Expressionsrate E2-abhängig regulierter Gene im Uterus von Wistar-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit 7OPN und E2 im Vergleich zu den nur mit der Trägersubstanz behandelten Kontrolltieren (=1). **A** uterotrophieassoziierte Gene **B** weitere E2-regulierte Gene. * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

Auch die Expression der mRNA von **ER β** ist im Uterus nach einer E2-Behandlung über 72 h deutlich auf das 0,4-fache der basalen Expressionsrate herunterreguliert. Aber auch 7OPN bewirkt eine signifikante, wenngleich nur schwache, Herunterregulation der mRNA-Expression dieses Gens im Uterus auf das 0,75-fache des Wertes der Negativkontrolle.

In den E2-behandelten Tieren wird die uterine mRNA-Expression von **C3** 7-fach hochreguliert. Nach gleich langer Behandlung mit 7OPN jedoch wurde eine sehr starke Herunterregulation der C3-mRNA-Expression festgestellt. Sie beträgt nur noch 1/50 der Expression in den Kontrolltieren.

Die mRNA-Expression von **Clusterin** sank aufgrund der 72-stündigen Behandlung mit E2, wie bereits zuvor beschrieben, auf 20% der uterinen Expressionsrate in den Kontroll-

tieren. Aber auch die 72-stündige Behandlung mit 7OPN führt zu einem signifikanten Rückgang der uterinen Clusterin-mRNA-Expression auf das 0,6-fache der Expression in den Uteri der Kontrolltiere.

Keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle zeigt die Expressionsrate des **Progesteronrezeptors** nach 72-stündiger E2-Behandlung. Demgegenüber bewirkt 7OPN einen deutlichen Anstieg der uterinen PR-Expression auf mehr als das Dreifache der basalen Expressionsrate.

Die uterine mRNA-Expressionsrate von **COX2** ist nach 72-stündiger E2-Behandlung deutlich verringert. Sie beträgt nur noch das 0,4-fache der Expressionsrate in den Uteri der trägersubstanzbehandelten Kontrolltiere. Die 7OPN-Behandlung bewirkte jedoch offenbar keine Veränderung der COX2-mRNA-Expression.

Uterine Expression Arylhydrocarbonrezeptor-regulierter Gene

Die zeitabhängige Expression des AhR und AhR-regulierter Gene ist in Abb. 3.11, S. 66 dargestellt.

Die mRNA-Expression des **AhR** ist nach Behandlung mit E2 schon nach 7 Stunden deutlich auf die Hälfte herunterreguliert. 24 h nach Behandlungsbeginn ist die Expressionsrate des AhR noch etwas weiter auf ca. 1/4 des ursprünglichen Niveaus gesunken. Auch nach 72 h E2-Behandlung ist tendentiell eine verringerte AhR-Expression erkennbar, wenngleich diese statistisch nicht signifikant ist.

Im Unterschied zur Behandlung mit E2 bewirkt die Behandlung mit 6DMAN keinerlei Veränderung der AhR-Expression.

Nach Behandlung mit 8PN ist ein zu E2 vergleichbares AhR-Expressionsmuster erkennbar. Wiederum ist nach 7- bzw. 24-stündiger Behandlung ein Rückgang der AhR-Expression auf weniger als die Hälfte erkennbar. 72 Stunden nach Behandlungsbeginn wurde jedoch ein leichter, nicht signifikanter Anstieg gegenüber der basalen Expression auf das 1,75-fache gemessen.

Nach 7-stündiger Behandlungszeit mit E2 ist zwar ein leichter statistisch auch nicht signifikanter Rückgang der **GSTA2**-mRNA-Expression gemessen worden, allerdings war die Expression auch in den Uteri der nur mit der Trägersubstanz behandelten Tiere extrem niedrig. Aufgrund dieser Tatsache konnte mit den Uterus-Proben der 24 h mit E2 behandelten Tiere auch nur eine zuverlässige Messung durchgeführt werden. Dieser Meßwert liegt allerdings bereits 40-fach über dem der Negativkontrolle. Nach 72-stündiger E2-Behandlung ist eine recht starke mRNA-Expression von GSTA2 erkennbar. Es wurde eine über 2000-fache Hochregulation festgestellt.

Im Gegensatz dazu konnte nach Behandlung mit 6DMAN keine Veränderung der Genexpression von GSTA2 gemessen werden.

Auch nach Behandlung mit 8PN wird zunächst keine Veränderung der Genexpression sichtbar. In den Uteri der 72 h mit 8PN behandelten Tiere wurde jedoch ein signifikanter Anstieg auf das 17-fache der basalen GSTA2-mRNA-Expression gemessen.

Bezüglich der mRNA-Expression von **Cyp1A1** liegen keine Daten der 72 h behandelten Tiere vor. Die vorhandenen Genexpressionsdaten aus den Uteri der 7 h und 24 h behandelten Tiere zeigen aber einen deutlichen Rückgang der Cyp1A1-Expression sowohl nach E2- als auch nach 8PN-Behandlung. Nach Behandlung mit E2 geht die Cyp1A1-Expression auf ca. 10% der basalen uterinen Expressionsrate zurück. Auch nach 24-stündiger E2-

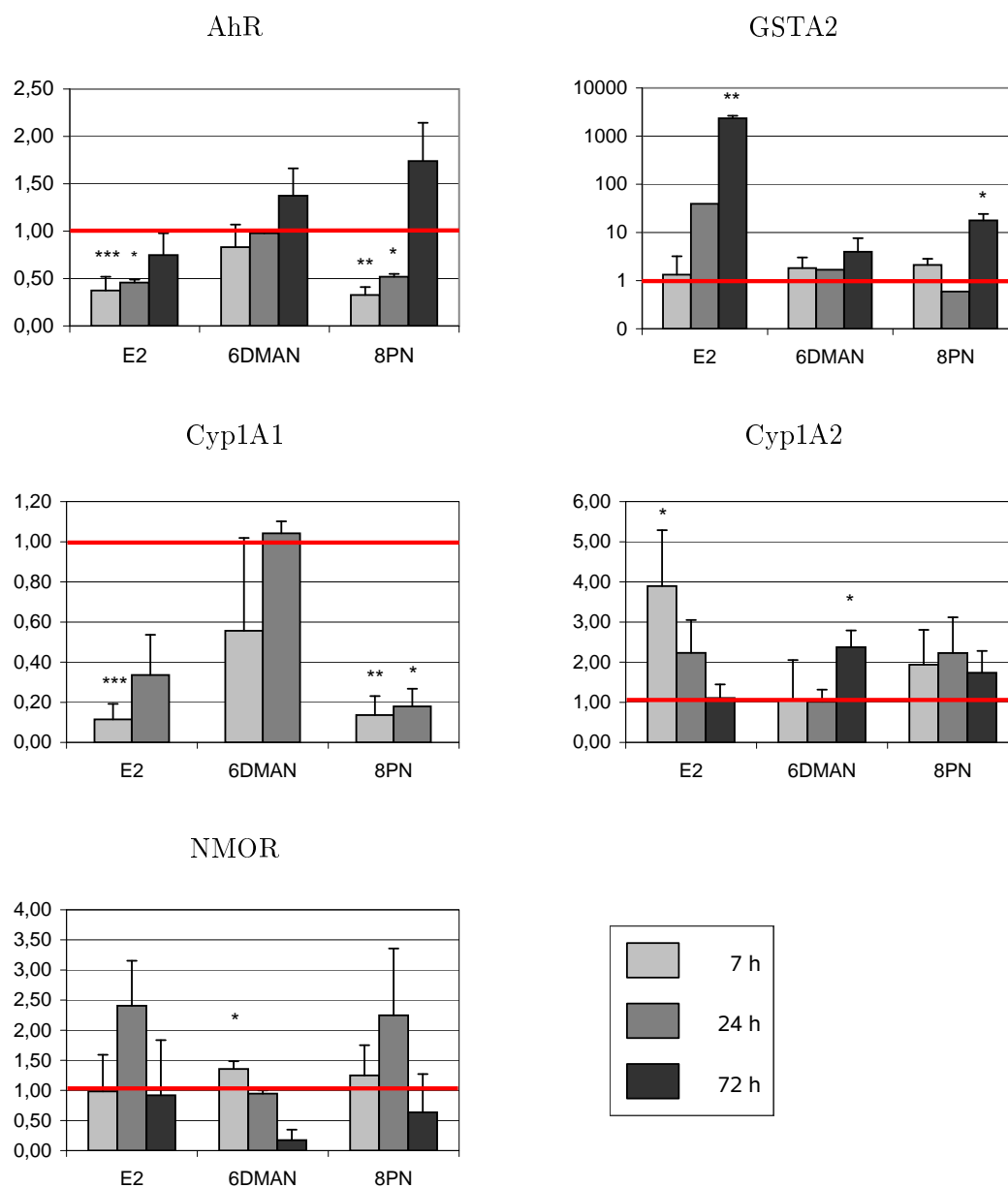


Abbildung 3.11: Zeitabhängige Regulation der mRNA-Expression des AhR, sowie der AhR-regulierten Gene GSTA2, Cyp1A1, Cyp1B1, und NMOR im Uterus von Wistar-Ratten nach Behandlung mit 6DMAN, 8PN und E2 über 7 h, 24 h und 72 h (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

Behandlung scheint noch eine Herunterregulation stattzufinden. Sowohl nach 7- als auch nach 24-stündiger 8PN-Behandlung geht die Cyp1A1-mRNA-Expressionsrate auf ca. 15-20% des Wertes der Negativkontrolle zurück. 6DMAN scheint jedoch keinen Einfluß auf die Cyp1A1-Expression zu haben.

Völlig anders sieht das uterine Expressionsmuster von **Cyp1A2** aus. Bei diesem Gen bewirkt E2 einen raschen Anstieg der Expression. Der höchste Wert mit dem 4-fachen der basalen Expressionsrate wurde nach 7-stündiger E2-Behandlung gemessen. Anschließend fällt die Expressionsrate wieder auf das Niveau der Negativkontrolle ab.

Die Behandlung mit 6DMAN bewirkt demgegenüber nur eine geringe Änderung der Cyp1A2-mRNA-Expression. Nach 72 h ist ein signifikanter Anstieg auf das 2,5-fache des Wertes der Negativkontrolle feststellbar.

Keine signifikante Änderung der Cyp1A2-Expression war nach Behandlung mit 8PN meßbar.

Obwohl die Messung der mRNA-Expression von **NMOR** mit einem großen Fehler behaftet war, wird deutlich, daß die NMOR-Expressionsmuster im Uterus nach Behandlung mit E2 und mit 8PN sehr ähnlich sind. Wahrscheinlich tritt in beiden Fällen eine biphasische Regulation auf, bei der nach einer Verzögerung (nach 7-stündiger Behandlung ist die Expressionsrate noch auf dem Niveau der Negativkontrolle) ein leichte Hochregulation stattfindet, welche in den 24 h behandelten Tieren sichtbar wird, die dann wieder abklingt, sodaß nach 72-stündiger Behandlung wiederum kein Unterschied zur Negativkontrolle festgestellt werden kann.

Die Behandlung mit 6DMAN bewirkt jedoch keine nennenswerte Änderung der uterinen NMOR-mRNA-Expression.

3.3.3 Genexpression in der Vena cava

In der Vena cava der hier untersuchten Wistar-Ratten wurden anders als im Uterus aus Zeitgründen nur die Expressionsmuster östrogenabhängig regulierter Gene nach Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN ermittelt. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.12 auf Seite 68 dargestellt. Bislang wurde weder der Einfluß von 7OPN auf die Genexpression in der Vena cava noch die zeitabhängige Expression Ah-Rezeptor-regulierter Gene untersucht.

Die mRNA-Expression von ER α konnte in der Vena cava aller Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. **ER β** war jedoch extrem schwach exprimiert, daher war es nicht möglich, die Regulation der Expression zuverlässig zu bestimmen, zumal offenbar nach keiner der durchgeführten Behandlungen ein starker Anstieg der ER β -mRNA-Expression zu beobachten war, welcher zu einer besseren Meßbarkeit der Expression dieses Gens geführt hätte. (Daten nicht dargestellt).

In einer ersten Serie von Messungen wurde die Expression aller untersuchten Gene in der Vena cava nach 24-stündiger Behandlung mit allen drei Testsubstanzen E2, 6DMAN und 8PN sowie der Proben der nur mit der Trägersubstanz behandelten Tiere durchgeführt. Daraufhin wurde nur die Expression derjenigen Gene auch nach den anderen beiden Behandlungszeiträumen von 7 h und 72 h untersucht, welche nach der Behandlungszeit von 24 h eine signifikante Veränderung der Genexpression unter einer der Testbedingungen zeigten. Keine Veränderte mRNA-Expression nach einer 24-stündigen Behandlung mit E2, 6DMAN oder 8PN zeigten die Gene **C3** und **VEGF**. Die Ergebnisse dieser Messungen

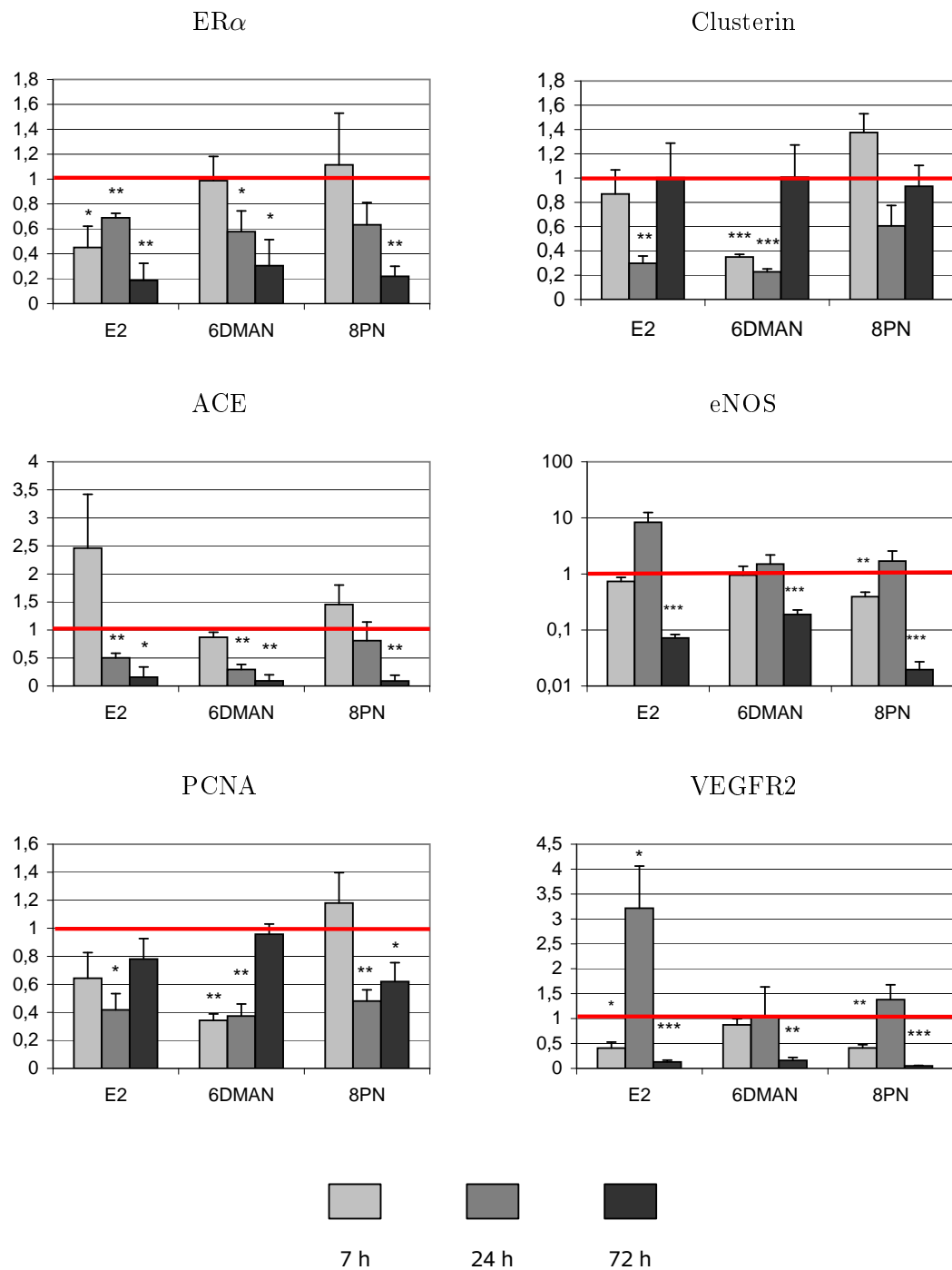


Abbildung 3.12: Zeitabhängige Regulation der Expression der Gene ER α , Clu, ACE, eNOS, PCNA und VEGFR2 in der Vena cava von Wistar-Ratten nach Behandlung mit E2, 6DMAN und 8PN über 7 h, 24 h und 72 h (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$), ** ($P \leq 0,01$) und *** ($P \leq 0,001$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an.

sind ebenfalls nicht abgebildet. Die Expressionsmuster aller weiteren untersuchten Gene sind in Abbildung 3.12 auf Seite 68 dargestellt.

Die mRNA-Expression von **ER α** ist nach E2-Behandlung in der Vena cava nach allen untersuchten Behandlungszeiten deutlich herunterreguliert. Nach einer Behandlungszeit von 7 h betrug die Expressionsrate von ER α ca. das 0,5-fache der basalen Expression. Nach 24 h wurde das 0,7-fache der Expression in der Vena cava der Kontrolltiere gemessen und nach 72-stündiger Behandlungszeit mit E2 sogar nur das 0,2-fache der ER α -mRNA-Expression in der Vena cava dieser Tiere.

Auch die Behandlung mit 6DMAN ruft eine verringerte ER α -mRNA-Expression hervor. Allerdings setzt die Herunterregulation offenbar erst später ein. Nach 7-stündiger Behandlungszeit ist noch kein Unterschied zur Negativkontrolle feststellbar. Nach einer Behandlungszeit von 24 h sinkt die Expressionsrate von ER α in der Vena cava jedoch auf das 0,6-fache der Expression in der Vena cava der Kontrolltiere und nach einer Behandlungszeit von 72 h wird nur noch der 0,3-fache Wert gemessen.

Beinahe identisch erscheint das Expressionsmuster von ER α nach Behandlung mit 8PN. Nach einem Behandlungszeitraum von 7 h ist noch keine veränderte ER α -mRNA-Expression feststellbar. Nach 24-stündiger Behandlung mit 8PN wird eine deutliche Tendenz zur Verringerung der ER α -Expression sichtbar und nach 72-stündiger Behandlung beträgt die mRNA-Expression von ER α in der Vena cava noch ca. das 0,3-fache der Expressionsrate in der Vena cava der Kontrolltiere.

Relativ ähnlich sind die Muster der mRNA-Expression von **Clusterin** in der Vena cava nach Behandlung mit den drei Testsubstanzen E2, 6DMAN und 8PN. Nach Behandlung mit E2 wird zwar eine Herunterregulation der Clu-Expression sichtbar, allerdings ist diese nach 7-stündiger Behandlungszeit nur tendentiell erkennbar und mathematisch nicht signifikant. Sehr deutlich wird sie erst nach 24-stündiger Behandlung mit E2. Die Clu-mRNA-Expression liegt nach dieser Behandlungszeit nur noch bei ca. 30% der Expressionsrate in der Vena cava der Kontrolltiere. Nach der E2-Behandlung über 72 h ist jedoch keine signifikante Regulation der Clu-mRNA-Expression mehr feststellbar.

Eine deutliche Verringerung der Clu-Expressionsrate in der Vena cava nach Behandlung mit 6DMAN ist bereits nach 7 h sichtbar. Es wurde weniger als das 0,4-fache der Expression in den Kontrolltieren gemessen. Die Clu-Expression sank nach 24-stündiger Behandlung noch weiter auf das 0,2-fache der basalen Expressionsrate. Genau wie nach Behandlung mit E2 steigt die Clu-mRNA-Expression in der Vena cava nach Behandlung mit 6DMAN nach 72 h wieder auf das Niveau der Expression in den Kontrolltieren an.

Auch nach Behandlung mit 8PN ist ein ähnliches Clu-Expressionsmuster in der Vena cava wie nach der Behandlung mit E2 in Form einer U-förmigen Kurve erkennbar. Nach einer Behandlungszeit von 7 h ist evtl. eine leicht erhöhte Clu-mRNA-Expression in der Vena cava erkennbar. Nach 24 h fällt die Expressionsrate wahrscheinlich auf ca. 60% der basalen Expression ab. Zum letzten Meßzeitpunkt nach 72 h ist wiederum kein Unterschied zur Expressionsrate in der Vena cava der Kontrolltieren mehr erkennbar.

Die mRNA-Expression von **ACE** ist in der Vena cava durch die Behandlung mit E2 biphasisch reguliert. Nach 7 h wurde eine tendentiell erhöhte Expression gemessen, wenngleich der Wert statistisch nicht signifikant ist. Nach 24-stündiger E2-Behandlung wurde eine Herunterregulation der ACE-mRNA-Expression in der Vena cava auf ca. 50% der Expression in der Negativkontrolle gemessen. Nach einem Behandlungszeitraum von 72 h geht die ACE-mRNA-Expression sogar noch weiter auf das 0,2-fache der basalen Expres-

sion in der Vena cava zurück.

Nach 7-stündiger Behandlung mit 6DMAN ist noch keine veränderte venöse ACE-Expression feststellbar. Im weiteren Verlauf wird die mRNA-Expression von ACE aber auch durch 6DMAN herunterreguliert. Sowohl nach einem Behandlungszeitraum von 24 h liegt die mRNA-Expressionsrate dieses Gens nur bei etwa dem 0,3-fachen der ACE-Expression in der Vena cava der Kontrolltiere. Nach 72-stündiger Behandlung mit 6DMAN beträgt die Expressionsrate nur noch das 0,1-fache des Wertes der Negativkontrolle.

Auch die Behandlung mit 8PN scheint eine Verringerung der ACE-mRNA-Expression in der Vena cava hervorzurufen. Auch in diesem Fall ist nach 7 h noch kein Unterschied zur Negativkontrolle zu beobachten. Nach 24 h ist ebenfalls nur eine leicht fallende Tendenz sichtbar, aber nach 72stündiger Behandlungszeit mit 8PN ist die venöse ACE-Expression signifikant auf ca. 10% der Expressionsrate in der Vena cava der Kontrolltiere gesunken.

Die Expression von **eNOS** wird in der Vena cava der Ratten ebenfalls deutlich durch die Behandlung mit E2 beeinflusst. Nach 7-stündiger Behandlungszeit ist allerdings noch kein Unterschied zur Negativkontrolle feststellbar. Nach einer Behandlungszeit von 24 h tritt wahrscheinlich eine Hochregulation der eNOS-Expression ein, wobei die Meßwerte statistisch nicht signifikant sind. Nach 72-stündiger Behandlung mit E2 geht die eNOS-Expression in der Vena cava jedoch stark zurück. Sie liegt dann nur noch bei weniger als 10% der Expressionsrate in den Trägersubstanz-behandelten Kontrolltieren.

Die Behandlung mit 6DMAN bewirkt weder nach 7 h noch nach 24 h eine Veränderung der venösen eNOS-mRNA-Expression. Nach einer Behandlungszeit von 72 h bewirkt aber auch die Behandlung mit 6DMAN eine Verringerung der eNOS-Expression auf 70%.

Für die Behandlung mit 8PN ergaben die Meßwerte nach 7 h eine leichte Verringerung der venösen eNOS-mRNA-Expression auf ca. 80% der Negativkontrolle. Nach 24-stündiger Behandlungszeit war kein Unterschied in der eNOS-mRNA-Expression in der Vena cava zwischen den 8PN-behandelten und nur mit der Trägersubstanz behandelten Tieren meßbar. Nach 72-stündiger Behandlung jedoch war eine deutliche Herunterregulation auf das 0,2-fache der eNOS-Expression in der Vena cava der 8PN-behandelten Tiere im Vergleich zur Negativkontrolle feststellbar.

Die Behandlung mit jeder der drei Testsubstanzen führte zu einer leichten Herunterregulation der mRNA-Expression von **PCNA**. Bei der Behandlung mit E2 lag der Meßwert nach 7-stündiger Behandlungszeit zwar noch nicht signifikant unter dem Niveau der Negativkontrolle, nach 24 h war jedoch eine deutliche Abnahme der PCNA-Expression auf das 0,4-fache der basalen Expressionsrate feststellbar. Nach 72-stündiger Behandlung mit E2 lag die mRNA-Expressionsrate von PCNA jedoch wieder auf dem Niveau der Negativkontrolle.

Die Behandlung mit 6DMAN verursacht bereits nach 7 h eine Herunterregulation der PCNA-mRNA-Expression in der Vena cava der Wistar-Ratten auf ca. 35% des Wertes der Negativkontrolle. Auch nach 24 h bleibt die Expressionsrate von PCNA in der Vena cava annähernd bei diesem Wert. Nach 27-stündiger Behandlung mit 6DMAN steigt sie jedoch wieder auf das basale Expressionsniveau an.

Nach 7-stündiger Behandlung mit 8PN ist noch keine Veränderung der Expressionsrate der PCNA-mRNA nachweisbar. Nach 24 h jedoch kommt es auch in diesem Fall zu einer deutlichen Verringerung der Expression auf ca. die Hälfte. Diese Herunterregulation ist auch nach 72-stündiger 8PN-Behandlung noch meßbar.

Wie oben erwähnt, war kein Einfluß der Testsubstanzen auf die VEGF-Expression in

der Vena cava nach 24-stündiger Behandlungszeit erkennbar. Der **VEGFR2** jedoch wurde durch alle drei Testsubstanzen deutlich in seiner Expressionsrate beeinflusst. Die Meßwerte ergaben für die Behandlung mit E2 eine Halbierte VEGFR2-mRNA-Expressionsrate nach 7 h, danach eine starke Hochregulation auf über 300% der Negativkontrolle nach 24 h und danach wiederum eine Herunterregulation auf ca. 20% der basalen Expressionsrate nach 72 h. Die Behandlung mit 6DMAN bewirkte weder nach 7 h noch nach 24 h eine signifikante Veränderung der VEGFR2-Expression. Nach 72-stündiger Behandlungszeit jedoch war eine Verringerung der VEGFR2-Expressionsrate ebenfalls auf ca. 20% des Wertes der Negativkontrolle feststellbar.

3.4 Tierversuch 2 über 17 Tage in DA/Han-Ratten

Dieser Tierversuch diente der Abschätzung der Wirkung von iCR auf Uterus und Gefäßsystem im Vergleich zu E2 bei längerfristiger Verabreichung. Dafür wurde wiederum das Uterusgewicht bestimmt, sowie die Expression E2-regulierter Gene in Uterus und Vena cava gemessen. Zusätzlich wurde aber auch die Genexpression in der Aorta als arteriellem Gefäß überprüft. Die Messung der Regulation der Expression wichtiger in Cholesterinstoffwechsel und -transport involvierter E2-regulierter Gene durch iCR in der Leber diente der Bestimmung des Einflusses von iCR auf das für die Gefäße ebenfalls bedeutsame Lipidprofil. Zur Identifizierung ER-vermittelter Wirkmechanismen wurde auch eine gleichzeitige Behandlung mit dem Antiöstrogen Fulvestrant durchgeführt.

3.4.1 Uterotropher Test

Abbildung 3.13 auf Seite 72 zeigt deutlich, daß die Behandlung mit E2 zu einer Erhöhung des **Uterusgewichtes** führt. Während das mittlere Uterusgewicht in den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe bei 0,12 g liegt, führte die Behandlung mit E2 zu einem Anstieg des mittleren Uterusgewichts um beinahe 300% auf ca. 0,4 g. Dieser Anstieg kann durch die gleichzeitige Behandlung mit dem Antiöstrogen Fulvestrant inhibiert werden. In allen anderen Behandlungsgruppen ist jedoch kein signifikanter Anstieg des Uterusgewichts zu beobachten.

Die mRNA-Expression der beiden Proliferationsmarker **PCNA** und **KI67** fiel in allen Behandlungsgruppen nach 17-tägiger Behandlung leicht unter das Expressionsniveau der Negativkontrolle. Eine Ausnahme bildet nur die Expression von KI67 nach iCR-Behandlung. Sie unterscheidet sich nicht signifikant von der Expression in der Negativkontrolle.

Die **VEGF**-mRNA-Expression bewegt sich am Ende des 17-tägigen Behandlungszeitraums ebenfalls in allen Behandlungsgruppen auf dem Niveau der Negativkontrolle.

3.4.2 Genexpression im Uterus

Die Expression aller weiteren untersuchten Gene im Uterus der Ratten aus dem ersten Tierversuch sind in Abbildung 3.14 auf Seite 73 dargestellt.

Es konnte die Expression von ER α sowie die Expression von ER β im Uterus der untersuchten Tiere nachgewiesen werden.

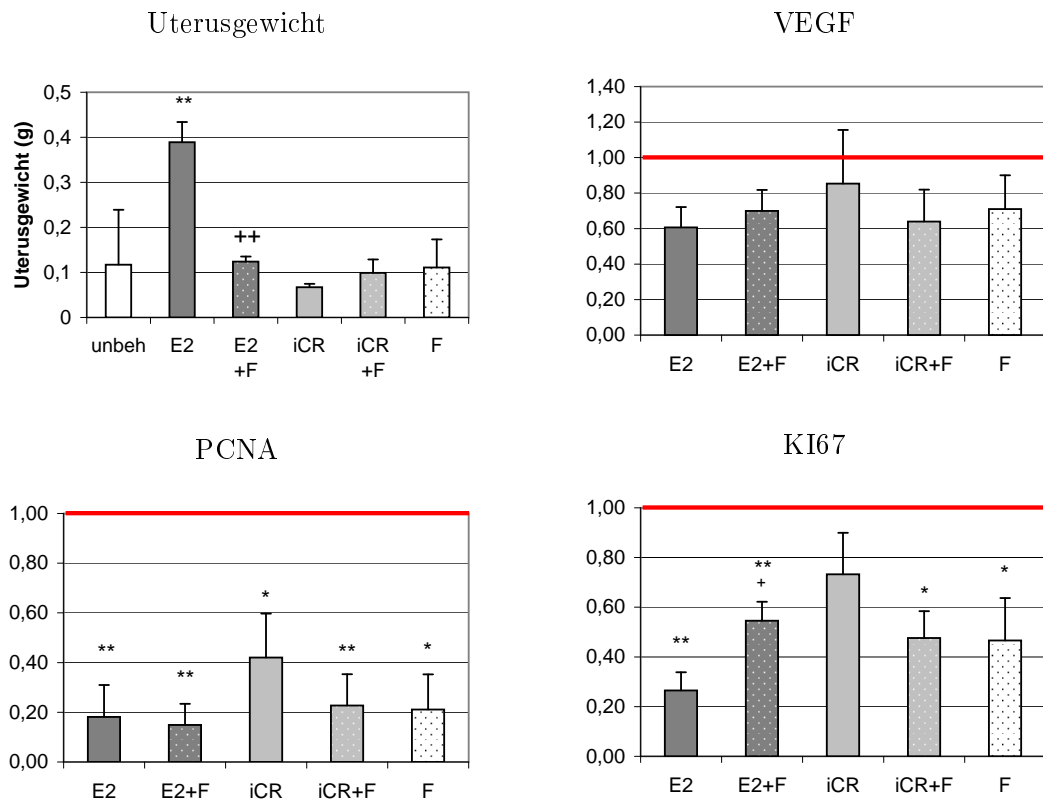


Abbildung 3.13: Uterusgewicht und Regulation der Expression Uterotrophie-assoziiierter Gene im Uterus von DA/Han-Ratten durch iCR und E2 nach 17-tägiger Behandlung (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

Sowohl die Expression von **ER α** als auch die Expression von **ER β** im Uterus ist nach E2-Behandlung auf die Hälfte bzw. auf 1/5 verringert. Die Verringerung der ER α -Expression wird durch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant vollständig antagonisiert, während dieser Effekt bei der Expression von ER β nur als nicht signifikante Tendenz erkennbar wird. iCR bewirkt einen schwachen aber signifikanten Anstieg der ER α -Expression, welche tendentiell auch durch Fulvestrant hervorgerufen wird. Diese Wirkung ist additiv, wie aus dem stärkeren Anstieg der ER α -Expression nach kombinierter iCR- und Fulvestrant-Behandlung hervorgeht. Weder iCR noch Fulvestrant rufen eine Änderung der Expression von ER β hervor.

Die mRNA-Expression von **Komplement C3** steigt nach E2-Behandlung im Uterus um mehr als das 200-fache im Vergleich zur Expression in der unbehandelten Kontrollgruppe an. Gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant kann die Hochregulation der C3-Expression durch E2 vollständig antagonisieren. Sowohl die Behandlung mit Fulvestrant allein, die Behandlung mit iCR, als auch die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant

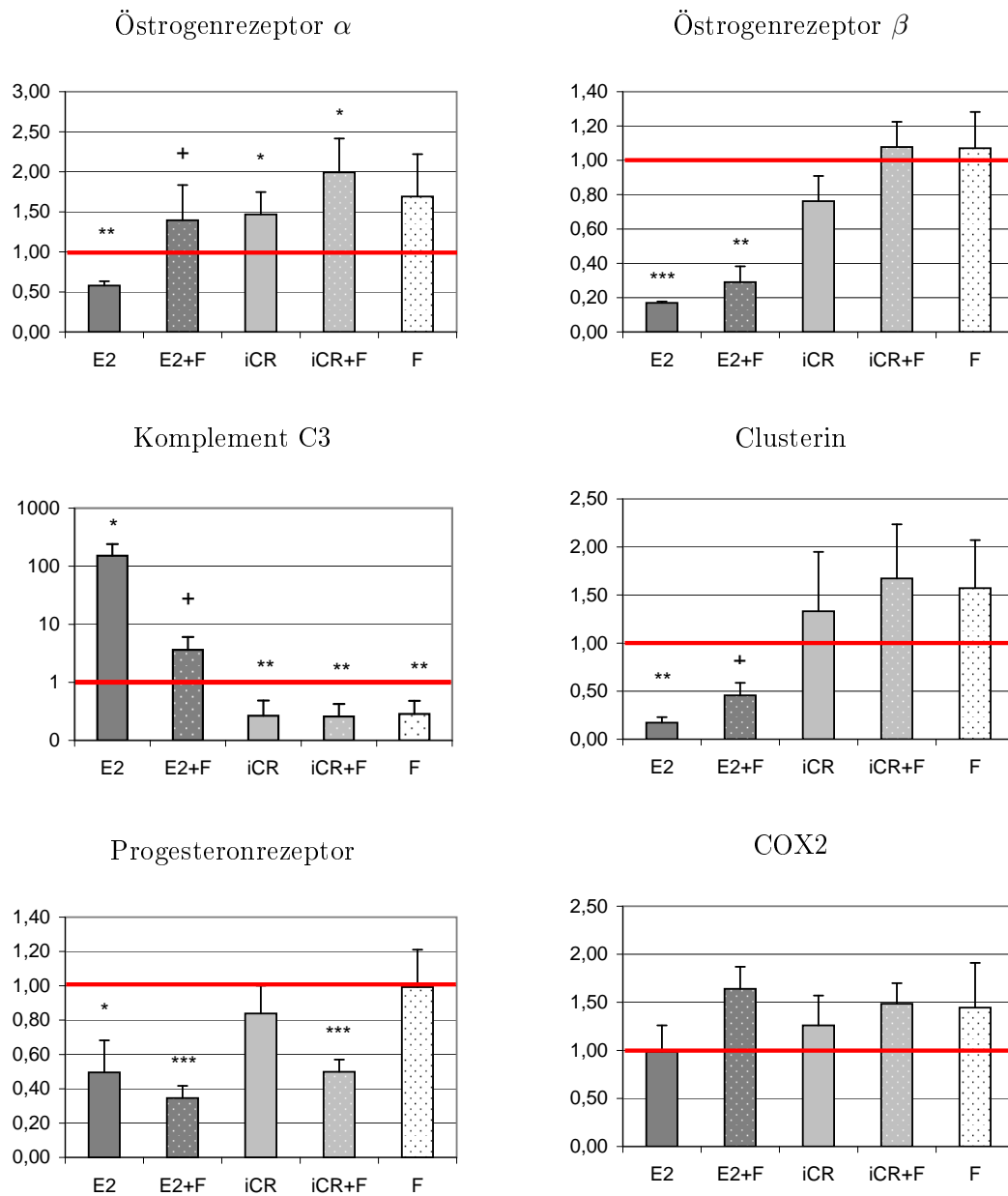


Abbildung 3.14: Relative Expressionsrate der E2-abhängig regulierten Gene ER α , ER β , C3, Clu, PR und COX2 im Uterus von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

führen zu einer signifikanten Verringerung der C3-mRNA-Expression auf ca. die Hälfte im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.

Die **Clusterin**-mRNA-Expression im Uterus ist nach 17-tägiger E2-Behandlung auf weniger als 1/4 der Expression in den Uteri der unbehandelten Kontrolltiere gesunken. Gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant führt zu einer teilweisen Antagonisierung der beobachteten Herunterregulation. Weder Fulvestrant allein noch iCR noch die kombinierte Behandlung mit iCR und Fulvestrant führten zu einer signifikanten Veränderung der Expression der Clusterin-mRNA in den Uteri.

Die Expression der **Progesteron**-Rezeptor mRNA ist nach 17-tägiger E2-Behandlung auf die Hälfte gesunken. Auch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant führt zu dem gleichen Ergebnis. iCR bewirkt keine Änderung der Expression. Die Behandlung mit einer Kombination von iCR und Fulvestrant bewirkt ebenfalls eine Senkung der mRNA-Expression auf die Hälfte im Vergleich mit den unbehandelten Tieren. Die Behandlung mit Fulvestrant allein bewirkt keine Änderung der PR-Expression.

Keine der durchgeführten Behandlungen führte zu einer signifikanten Änderung der Expression der **COX2**-mRNA.

3.4.3 Genexpression in der Vena cava

Die Expressionsmuster der in der Vena cava untersuchten Gene sind auf zwei Abbildungen verteilt dargestellt. Abbildung 3.15 auf Seite 75 zeigt die Expression von ER α , Clusterin, KI67, PCNA und Komplement C3.

Ebenso wie im Uterus wird **ER α** durch die E2-Behandlung herunterreguliert. Die mRNA-Expressionsrate beträgt nach 17 Tagen noch ca. 40% der Expression in den Venae cavae der unbehandelten Kontrolltiere. Fulvestrant antagonisiert den Effekt von E2 auf die ER α -Expression vollständig. Die Behandlung mit iCR führt weder allein noch in Kombination mit Fulvestrant zu einer signifikanten Änderung der ER α -Expression. Die alleinige Behandlung mit Fulvestrant führt jedoch ebenfalls zu einer leichten Herunterregulation der Expression der ER α -mRNA.

Eine Expression von **ER β** konnte in der Vena cava der DA/HAN-Ratten nach keiner der durchgeführten Behandlungen nachgewiesen werden.

Auch die Expression der mRNA von **Clusterin** wird in der Vena cava nach 17-tägiger E2-Behandlung herunterreguliert. Die Expressionsrate liegt bei ca. 60% im Vergleich zur Clusterin-Expression in den Venae cavae der unbehandelten Kontrolltiere. Zwar deutet die gemessene mittlere Expression bei gleichzeitiger Behandlung mit E2 und Fulvestrant auf eine E2-antagonisierende Wirkung von Fulvestrant in Bezug auf die Clusterin-mRNA-Expression in der Vena cava hin, allerdings sind die Meßwerte statistisch nicht signifikant. Wiederum ließ sich kein Effekt der iCR-Behandlung auf die Expression der Clusterin mRNA nachweisen. Auch in Kombination mit Fulvestrant bleibt die mRNA-Expression von Clusterin in der Vena cava unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit Fulvestrant allein führt jedoch zu einer sehr leichten, aber signifikanten Verringerung der Clusterin-mRNA-Expression.

Auch die Expression der mRNA des Proliferationsmarkers **KI67** in der Vena cava ist nach E2-Behandlung über einen Zeitraum von 17 Tagen auf ca. 60% verringert. Die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant verhindert auch bei der KI67-mRNA diese Herunterregulation vollständig. iCR hat wiederum keinen Einfluß auf die KI67-mRNA-Expression

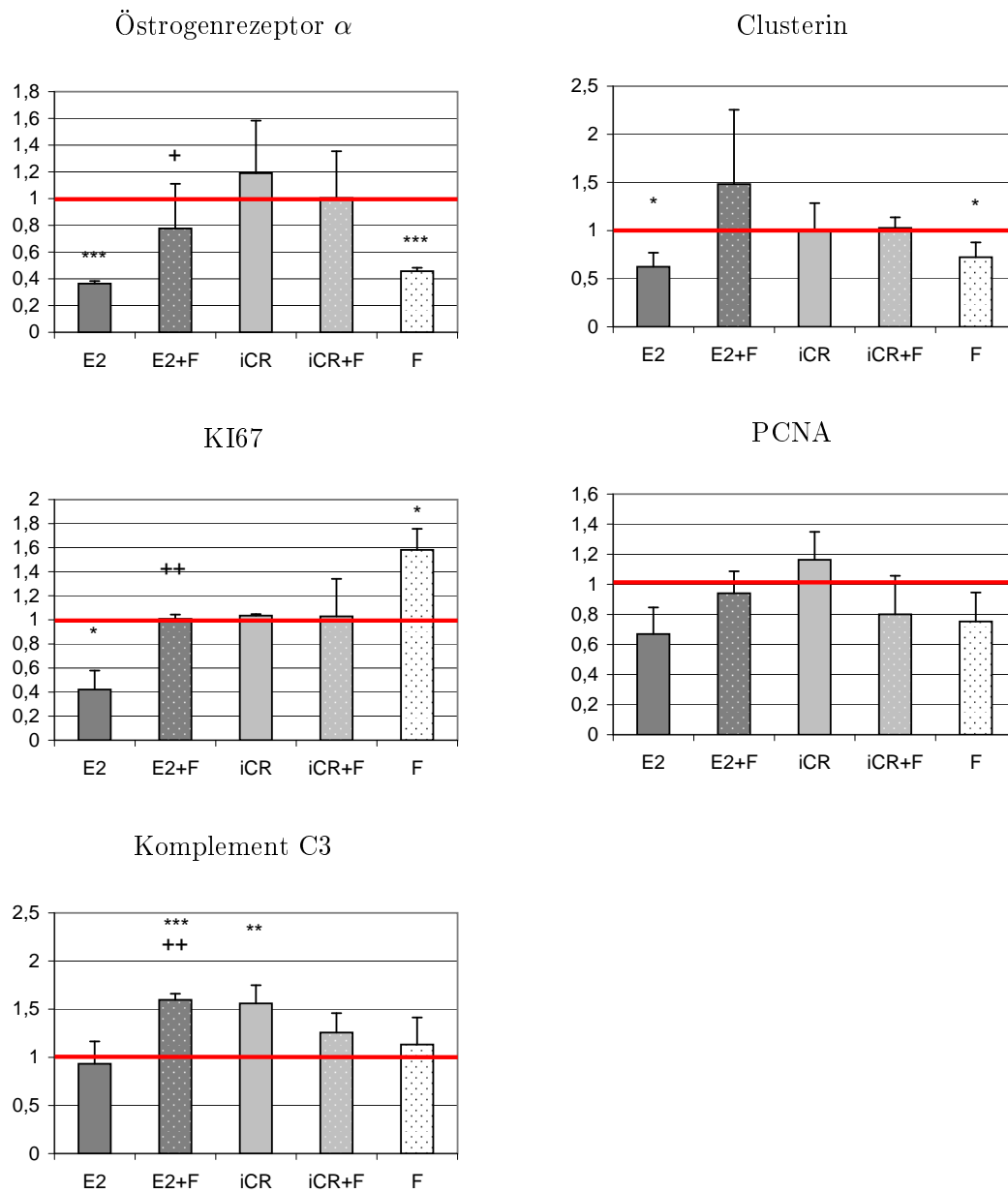


Abbildung 3.15: Relative Expressionsrate der E2-abhängig regulierten Gene $ER\alpha$, Clu, KI67, PCNA und C3 in der Vena cava von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies trifft auch auf die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant zu. Die ausschließliche Behandlung mit Fulvestrant führt schließlich zu einem Anstieg der Expression der KI67 mRNA in der Vena cava auf das 1,6-fache des Wertes in den Venae cavae der unbehandelten Kontrolltiere.

Die mRNA-Expression des zweiten getesteten Proliferationsmarkers **PCNA** blieb nach allen Behandlungen in der Vena cava unverändert im Vergleich zur Expression in den unbehandelten Kontrolltieren.

Die Expression der mRNA von **Komplement C3** bleibt nach 17-tägiger E2-Behandlung in der Vena cava der Ratten unverändert. Die Kombination mit Fulvestrant führt jedoch zu einem signifikanten Anstieg der C3-Expression auf das 1,5-fache der Expression in der Vena cava der unbehandelten Kontrolltiere. Auch iCR führt zu einem Anstieg der C3-Expression auf den gleichen Wert. Die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant, wie auch die Behandlung mit Fulvestrant allein führt zu keiner Änderung der Expression der C3-mRNA.

Die Expressionsprofile der Gene eNOS, ACE, COX2 und VEGF sind in Abbildung 3.16 auf Seite 77 dargestellt.

Die Behandlung mit E2 über einen Zeitraum von 17 Tagen führt in der Vena cava der Ratten zu keiner Veränderung der mRNA-Expression von **eNOS**. Auch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant führt zu keiner Änderung der eNOS-mRNA-Expression. Nach iCR-Behandlung ist ein geringer 1,3-facher Anstieg der eNOS-mRNA-Expression in der Vena cava im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten. Dieser Anstieg ist bei gleichzeitiger Behandlung mit Fulvestrant noch deutlicher. Hier ist eine Verdopplung der eNOS-mRNA-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle zu beobachten. Nach alleiniger Behandlung mit Fulvestrant war keine Veränderung der Expression der eNOS-mRNA in der Vena cava im Vergleich zur Expression in den unbehandelten Kontrolltieren feststellbar.

Die mRNA von **ACE** wird in der Vena cava nach 17-tägiger E2-Behandlung auf ca. 50% der Expression in den unbehandelten Kontrolltieren herunterreguliert. Fulvestrant antagonisiert diesen Effekt nahezu vollständig. Auch die Behandlung mit iCR führt zu einer geringen Herunterregulation der ACE-mRNA-Expression in der Vena cava auf das 0,8-fache der Expression in der Negativkontrolle. Hier führt Fulvestrant zu keiner signifikanten Verringerung des Effekts. Nach ausschließlicher Behandlung mit Fulvestrant konnte ebenfalls eine Verringerung der mRNA-Expression von ACE auf ca. 40% gemessen werden.

Die **COX2**-mRNA wird durch E2 in der Vena cava der DA/Han-Ratten stark herunterreguliert. Ihre Expression beträgt nach der 17-tägigen Behandlung nur noch 15% der Expression in der Vena cava der unbehandelten Kontrolltiere. Fulvestrant kann diesen Effekt in der eingesetzten Konzentration nur teilweise antagonisieren. Auch die iCR-Behandlung führt zu einer signifikanten Verringerung der COX2-mRNA-Expression auf das 0,7-fache des Wertes der Negativkontrolle. Bei der kombinierten Behandlung mit iCR und Fulvestrant kann die gleiche Verringerung der COX2-mRNA-Expression beobachtet werden. Nach der alleinigen Behandlung mit Fulvestrant wurde sogar eine Halbierung der COX2-Expression in der Vena cava im Vergleich zur Negativkontrolle festgestellt.

Eine statistisch signifikante Regulation der Expression der **VEGF**-mRNA in der Vena cava konnte nach keiner der durchgeführten Behandlungen beobachtet werden.

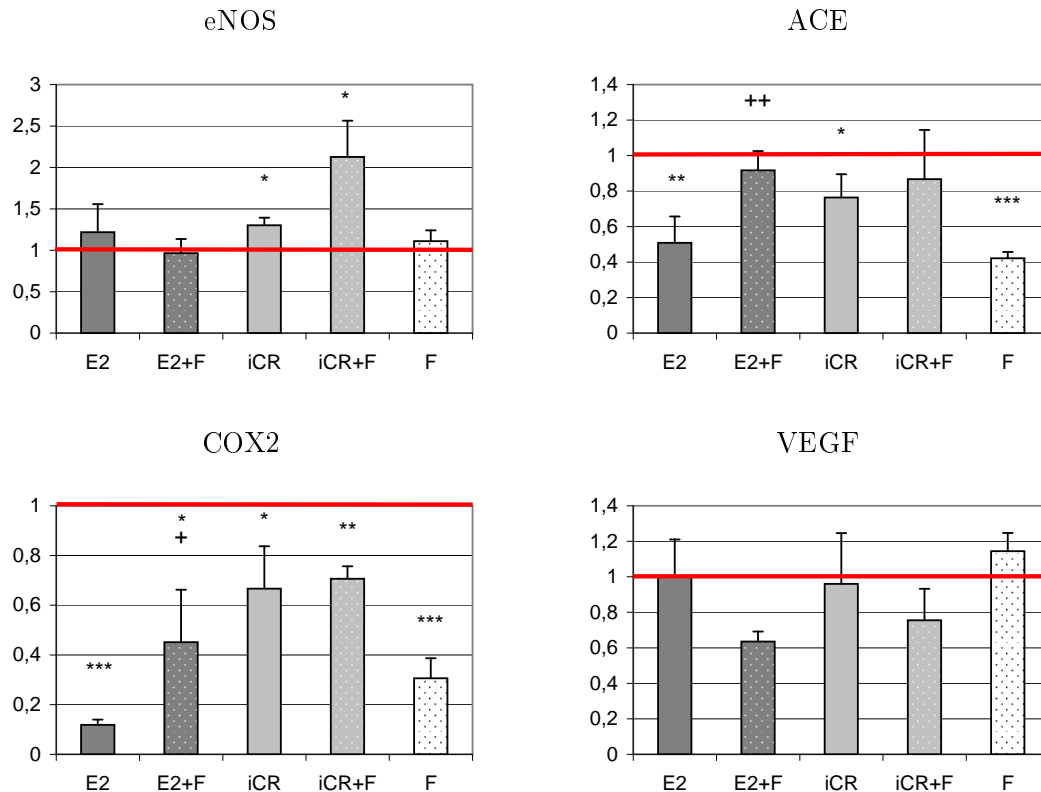


Abbildung 3.16: Relative Expressionsrate der E2-abhängig regulierten Gene eNOS, ACE, COX2 und VEGF in der Vena cava von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

3.4.4 Genexpression in der Aorta

Die mRNA-Expressionsmuster in der Aorta sind ebenfalls auf zwei Abbildungen verteilt dargestellt. Abbildung 3.17 auf Seite 78 zeigt die Expression von $ER\alpha$, Progesteronrezeptor, KI67, PCNA, Clusterin und Komplement C3.

Die mRNA-Expression von **$ER\alpha$** in der Aorta ist nach 17-tägiger Behandlung auf das ca. 0,4-fache der Negativkontrolle gesunken. Dies ändert sich auch durch gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant nicht. Sowohl die Behandlung mit iCR, als auch die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant rufen keine Änderung der $ER\alpha$ -mRNA-Expression hervor. Nach 17-tägige Behandlung mit Fulvestrant allein ist jedoch wiederum eine signifikante Verringerung der Expression der $ER\alpha$ -mRNA auf das 0,4-fache des Wertes in der Aorta der unbehandelten Kontrolltiere meßbar.

Es konnte keine Expression von **$ER\beta$** in der Aorta der untersuchten Ratten nachgewiesen werden.

Die Expression **Progesteronrezeptor**-mRNA zeigt im Vergleich zur Negativkontrolle

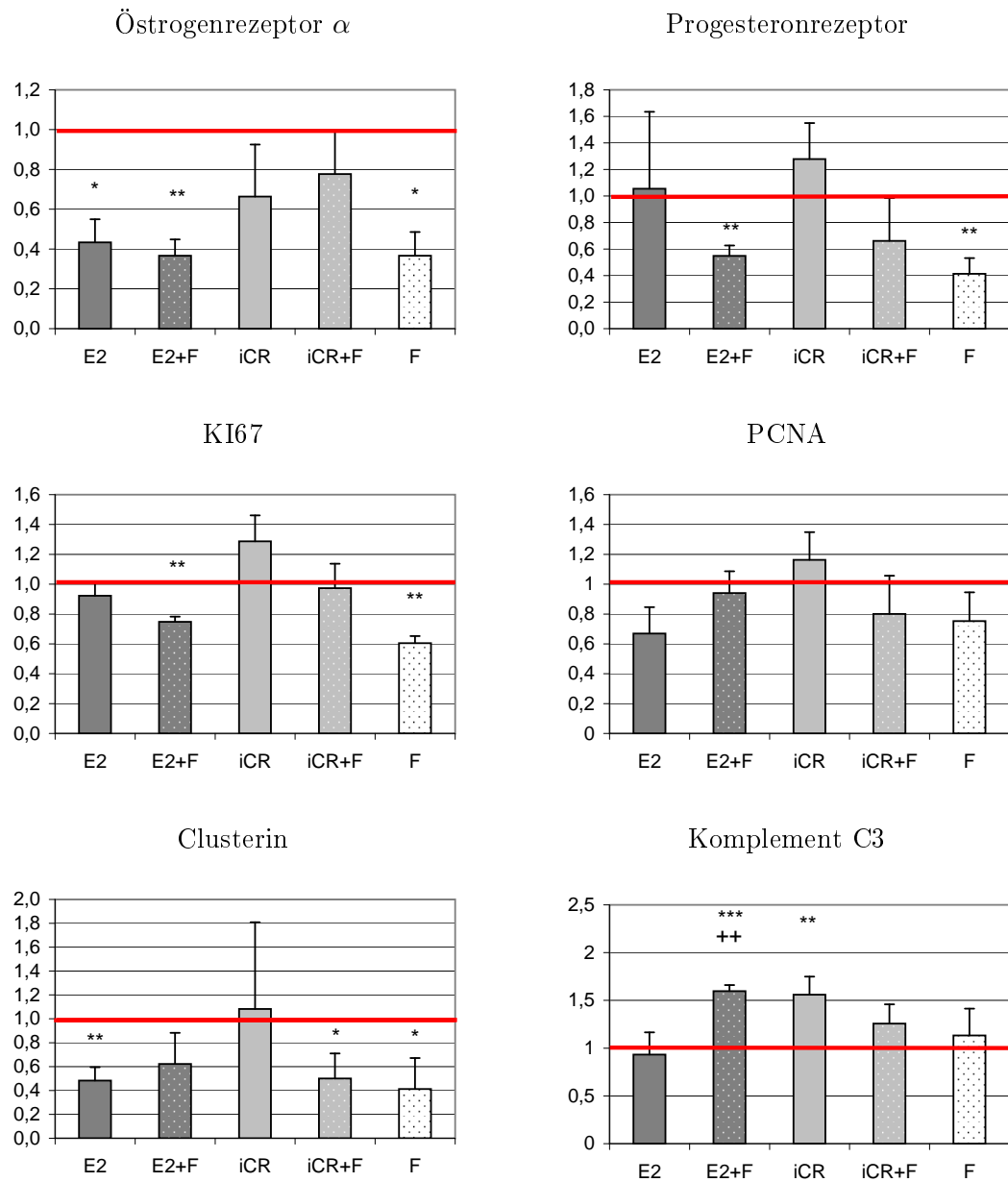


Abbildung 3.17: Relative Expressionsrate der E2-abhängig regulierten Gene ER α , PR, KI67, PCNA, Clu und C3 in der Aorta von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

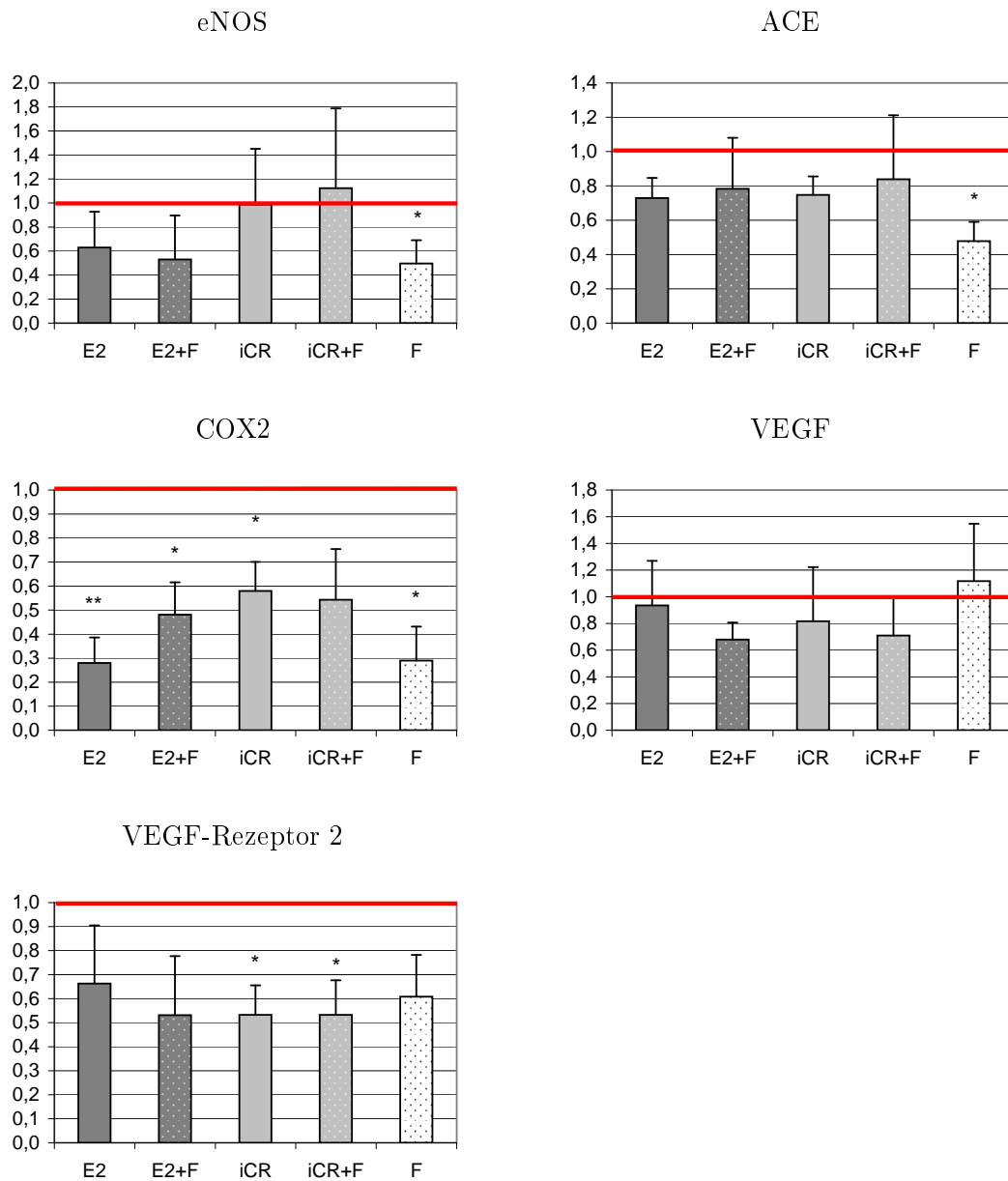


Abbildung 3.18: Relative Expressionsrate der E2-abhängig regulierten Gene eNOS, ACE, COX2, VEGF und VEGFR2 in der Aorta von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

keine Veränderung der Expressionsrate nach 17-tägiger E2-Behandlung. Auch nach iCR-Behandlung ist keine Veränderung meßbar. Die Behandlung mit Fulvestrant bewirkt jedoch sowohl allein, als auch in Kombination mit E2 eine Verringerung der PR-mRNA-Expression am Ende des Behandlungszeitraums auf ca. die Hälfte der Expressionsrate in den Aorten der unbehandelten Kontrolltiere. Auch in Kombination mit iCR ist dieser Effekt möglicherweise vorhanden. Die Daten sind jedoch aufgrund der großen Standardabweichung nicht eindeutig.

Weder die Behandlung mit E2 noch mit iCR führen zu einer veränderten Expression des Proliferationsmarkers **KI67** am Ende des Behandlungszeitraums in der Aorta. Die Behandlung mit Fulvestrant führt zu einer signifikanten Verringerung der KI67-mRNA-Expression sowohl allein, als auch in Kombination mit E2. Die gemeinsame Behandlung mit iCR und Fulvestrant bewirkt keine Veränderung der mRNA-Expression von KI67.

Der zweite untersuchte Proliferationsmarker **PCNA** weist in der Aorta nach keiner der durchgeführten Behandlungen eine signifikant veränderte mRNA-Expression auf.

Die mRNA-Expression von **Clusterin** ist in der Aorta nach E2-Behandlung zwar auf ca. die Hälfte im Vergleich zur Expression in den unbehandelten Kontrolltieren verringert, allerdings ist aufgrund der großen Standardabweichung der Meßergebnisse nicht eindeutig nachweisbar, ob dieser Effekt durch die gleichzeitige Verabreichung von Fulvestrant antagonisierbar ist. Die 17-tägige Behandlung mit iCR führt zu keiner Veränderung der Expression der Clusterin-mRNA in der Aorta. Die Behandlung mit Fulvestrant führt im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer auf das 0,4-fache verringerten Clusterin-mRNA-Expression. Auch die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant führt zu einer auf die Hälfte verringerten Expression am Ende des 17-tägigen Behandlungszeitraums.

Auf die Regulation der mRNA von **Komplement C3** in der Aorta scheint E2 am Ende des 17-tägigen Behandlungszeitraums keinen Einfluß zu haben. Sowohl nach gleichzeitiger Behandlung mit E2 und Fulvestrant und nach Behandlung mit iCR ist jedoch eine Hochregulation der C3-mRNA auf das 1,5-fache der Expression in den Aorten der unbehandelten Kontrolltiere meßbar. Die Behandlung mit Fulvestrant und iCR, sowie die Behandlung mit Fulvestrant allein bewirken wiederum keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression von C3 in der Aorta der untersuchten Ratten am Ende der Behandlungszeit.

Abbildung 3.18 auf Seite 79 zeigt die mRNA-Expression von eNOS, ACE, COX2, VEGF und VEGF-Rezeptor 2 in der Aorta.

Auch wenn die Behandlung mit E2 und mit E2 und Fulvestrant in Kombination eine leichte Herunterregulation der **eNOS**-mRNA-Expression nach 17 Tagen in der Aorta zu bewirken scheinen, so kann dies aufgrund der großen Standardabweichungen nicht statistisch belegt werden. Die Behandlung mit iCR führt zu keiner Änderung der mRNA-Expression von eNOS im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies gilt auch für die kombinierte Behandlung mit iCR und Fulvestrant. Nach der alleinigen Fulvestrant-Behandlung jedoch ist eine signifikante Verringerung der Expression der eNOS-mRNA in der Aorta auf ca. die Hälfte des Wertes in den unbehandelten Kontrolltieren feststellbar.

Das Expressionsmuster von **ACE** in der Aorta zeigt das gleiche Bild. Während weder die 17-tägige Behandlung von E2 noch von iCR noch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant eine signifikante Änderung der mRNA-Expression in der Aorta bewirken, wird durch die Behandlung mit Fulvestrant allein eine Herunterregulation der ACE-Expression auf ca. 50% des Wertes in den unbehandelten Kontrolltieren erreicht.

Die Expression der mRNA von **COX2** war im Vergleich zur Negativkontrolle in der Aorta unter allen getesteten Bedingungen leicht herunterreguliert. Allerdings wies die Statistik den Wert für die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant als nicht signifikant aus.

Die Expression der mRNA von **VEGF** hingegen blieb unter allen getesteten Bedingungen unverändert.

Die mRNA des **VEGFR-Rezeptors 2** scheint tendentiell ähnlich der von COX2 nach allen durchgeführten Behandlungen herunterreguliert zu sein. Allerdings ist, verursacht durch relativ hohe Standardabweichungen, nur die Werte für die Gruppen, die mit iCR bzw. mit iCR und Fulvestrant behandelt wurden, eine statistisch sichere Aussage möglich. Hier beträgt die Herunterregulation der VEGFR2-mRNA in der Aorta ca. 50% im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.4.5 Genexpression in der Leber

Auch in der Leber wurde die Expression mehrerer Östrogen-regulierter Gene untersucht, von denen Cyp7A1, ApoA1 Einfluß auf den Cholesterinmetabolismus bzw. -transport haben und somit von Relevanz für das Gefäßsystem sind. Die Expressionsprofile dieser Gene sind in Abbildung 3.19 auf Seite 82 dargestellt.

Die mRNA-Expression von **ER α** ist nach 17-tägiger E2-Behandlung auf das 1,5-fache heraufreguliert. Dieser Effekt scheint durch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant teilweise antagonisierbar zu sein, denn die Expression der ER α -mRNA in der Leber dieser Tiere weicht nicht signifikant von der in der Leber der unbehandelten Kontrolltiere ab. Andererseits ist aufgrund der Standardabweichungen kein signifikanter Unterschied feststellbar, wenn man die Expression in den mit E2 und mit E2 und Fulvestrant gleichzeitig behandelten Tieren direkt miteinander vergleicht. Darüberhinaus war in keiner der weiteren Behandlungsgruppen (iCR, iCR + Fulvestrant, Fulvestrant) eine signifikante Veränderung der mRNA-Expression im Vergleich zur Expression in der Leber der unbehandelten Kontrolltiere feststellbar.

Ebenfalls untersucht wurde die hepatische Expression von **Clusterin** in allen Behandlungsgruppen. Wie auch im Uterus führt die 17-tägige Behandlung mit E2 zu einer leichten Verringerung der Clusterin-mRNA-Expression im Vergleich zur Expression in der Leber der unbehandelten Kontrolltiere. Die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant kann die Herunterregulation der Expression der Clusterin-mRNA antagonisieren. In allen weiteren Behandlungsgruppen war keine signifikante Veränderung der Clusterin-Expression in der Leber feststellbar.

Auch die mRNA-Expression von **Komplement C3** scheint in der Leber in allen Behandlungsgruppen weitgehend unverändert zu sein. Lediglich die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant scheint einen leichten Anstieg der C3-Expression in der Leber auf das 1,7-fache des Wertes der Negativkontrolle hervorzurufen.

Die in der Leber untersuchten Gene mit funktioneller Bedeutung für das Gefäßsystem, ApoA1 und Cyp7A1 zeigen jedoch eine deutlich östrogenabhängige Regulation ihrer Expression. Die mRNA-Expression von **ApoA1** ist nach 17-tägiger E2-Behandlung auf das 1,8-fache der Expression in der Negativkontrolle hochreguliert. Die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant führt zu einer beinahe vollständigen Antagonisierung dieses Effekts. Die Wirkung von iCR und Fulvestrant allein sowie in Kombination auf die hepatische

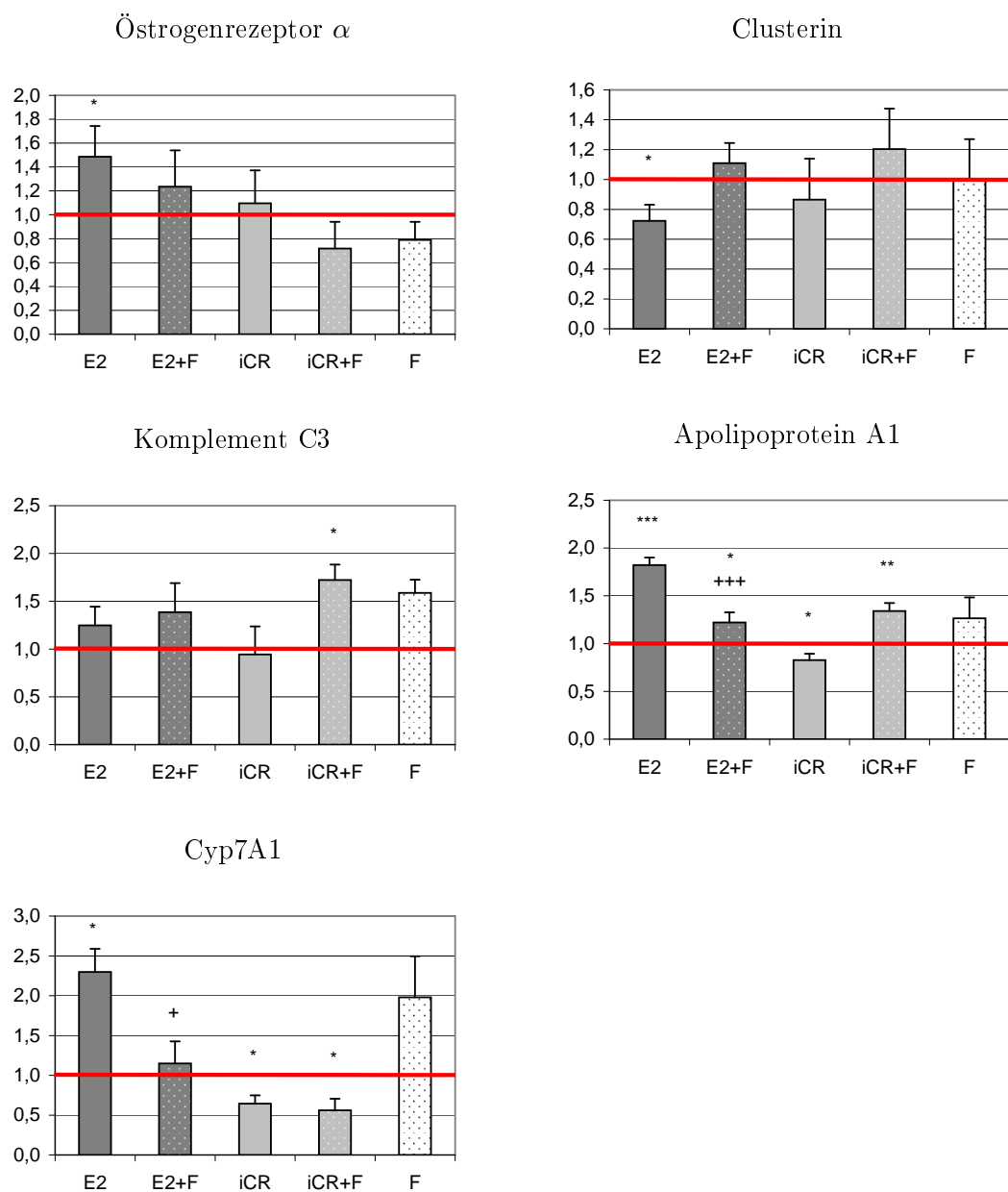


Abbildung 3.19: Relative Expressionsrate östrogenabhängig regulierter Gene in der Leber von DA/Han-Ratten nach 17-tägiger Behandlung mit iCR und E2 (unbehandelt=1). * ($P \leq 0,05$) und ** ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle an. + ($P \leq 0,05$) und ++ ($P \leq 0,01$) zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlung mit E2 bzw. iCR und kombinierter Behandlung mit E2 bzw. iCR und Fulvestrant an.

ApoA1-Expression ist äußerst schwach, wenngleich nach iCR-Behandlung eine signifikante Herunterregulation der ApoA1-mRNA-Expression festgestellt wurde und die gleichzeitige Behandlung mit iCR und Fulvestrant zu einer geringen Erhöhung der mRNA-Expression von ApoA1 zu führen scheint.

Auch die Expression der mRNA von **Cyp7A1** in der Leber ist nach 17-tägiger E2-Behandlung stark hochreguliert. Sie beträgt ca. das 2,3-fache der Expressionsrate in der Leber der unbehandelten Kontrollgruppe. Auch hier war eine Antagonisierung durch gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant möglich. Die 17-tägige Behandlung mit iCR führt sowohl allein als auch in Kombination mit Fulvestrant zu einer leichten Verringerung der Cyp7A1-mRNA-Expression auf das 0,6-fache der Expressionsrate der Negativkontrolle. Die ausschließliche Behandlung mit Fulvestrant scheint jedoch keinen Einfluß auf die Cyp7A1-Expression zu haben.

4 Diskussion

Ein Teil meiner Arbeit bestand darin, die verwendeten Methoden, insbesondere die Gewinnung von HUVECs und die *in vitro*-Methoden zu etablieren. Weiterhin ist das Wissen um die Stärken und Schwachpunkte dieser Methoden wichtig, um die Ergebnisse hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit interpretieren zu können. Daher werden zuerst kurz die Methoden diskutiert, bevor ausführlich die Ergebnisse interpretiert werden.

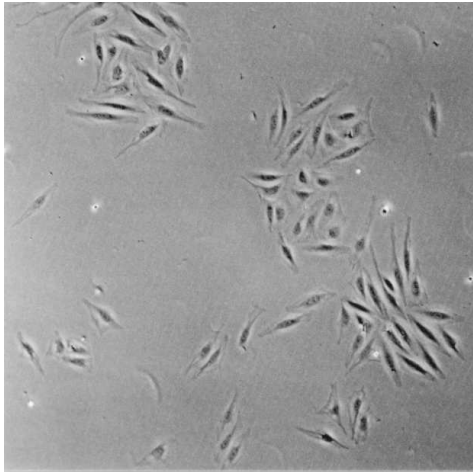
4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 HUVEC-Zellkultur

Ziel war es ein *in vitro*-Modell zur Erfassung östrogener Effekte auf die Gefäßwand zu etablieren. Zwar wurde auch die immortale Endothelzelllinie HECV, welche aus HUVECs hervorgegangen ist auf ihre Eignung als ein solches Modell getestet, diese zeigte jedoch in Genexpressionsexperimenten keine typische E2-abhängige Genregulation. Ihre Morphologie entsprach bei mikroskopischer Betrachtung auch nicht der typischen „Pflastersteinstruktur“ der HUVECs, sodaß von ihrer weiteren Verwendung abgesehen wurde und stattdessen Primärzellen aus Nabelschnurvenen gewonnen wurden.

Vorversuche zeigten eine leicht verbesserte Proliferationsrate in Gelatine-beschichteten Zellkulturflaschen. Zur Überprüfung der Reinheit der Zellkultur erwies sich die mikroskopische Betrachtung als ausreichend, da Endothelzellen zum Einen eine typische Morphologie

A



B

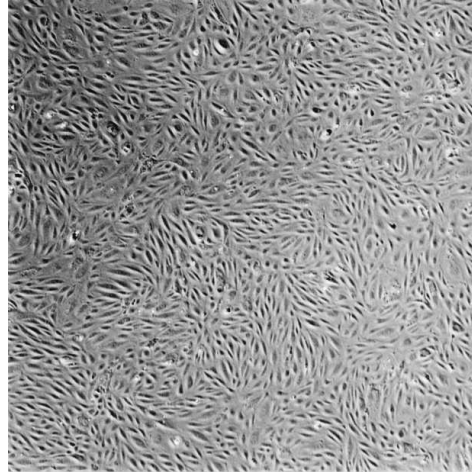


Abbildung 4.1: HUVEC **A** 1 Tag nach Gewinnung der Zellen aus einer Nabelschnurvene (100x vergrößert) und **B** nach einer Passage mit 100%iger Konfluenz (40x)

zeigen (siehe Abbildung 4.1) und zum Anderen die unter der Endothelzellschicht liegende extrazelluläre Matrix eine Verunreinigung der Zellkultur mit glatten Muskulaturzellen der Gefäßwand bei der Gewinnung der HUVECs wirkungsvoll verhindert.

Ein wichtiger Marker für Endothelzellen ist der von-Willebrandt-Faktor (231). Seine Expression wurde einmalig in einer Zellkultur von der 0. bis zur 4. Passage auf gleichmäßig hohem Niveau gezeigt (Daten nicht gezeigt). Dies diente als Nachweis für den Erhalt der Eigenschaften von Endothelzellen in den HUVECs bis zu diesem Zeitpunkt und erlaubte die Verwendung der HUVECs bis zur 4. Passage für die durchgeführten Experimente. Auch Autoren anderer Studien geben an, HUVECs bis zur 4. Passage oder länger einzusetzen (232, 233).

Die Proliferationsrate war je nach Nabelschnur, aus der die Zellen stammten, leicht unterschiedlich und auch die Östrogenresponsivität schien nicht immer gleich gut zu sein, wie man auch an den Proliferationstests sehen kann, wo nur zum Teil eine östrogenabhängige Zunahme der Proliferation erkennbar ist (Abb. 3.2, S. 53). Auch in anderen Veröffentlichungen wurde häufig, aber nicht immer eine proliferative Wirkung von E2 auf HUVECs festgestellt (232, 234, 235). Dies zeigt, daß sich HUVECs unterschiedlicher Quellen offenbar bezüglich ihrer E2-Sensitivität unterschiedlich verhalten. Es war daher für alle Experimente wichtig, falls die Zellen für ein Experiment aus mehreren Abschnitten einer Nabelschnur oder aus mehreren Nabelschnüren gewonnen wurden, diese beim ersten Passagieren zu mischen, sodaß keine Unterschiede zwischen den mit den verschiedenen Zellkulturen behandelten Testsubstanzen bestanden.

4.1.2 Proliferationstest

Der Proliferationstest mittels BCA mißt den Gesamtproteingehalt der Zellkultur. Dafür wurden die Zellen in den 96-Wellplatten ausgebracht und behandelt, in denen dann auch gemessen wurde. Eine mögliche Fehlerquelle stellt die Gelatinebeschichtung dar, die für ein besseres Wachstum der Zellen aufgebracht wurde.

Dabei wurde wie oben beschrieben, deutlich, daß die für den Proliferationstest eingesetzten HUVECs nicht in allen Fällen eine signifikant E2-abhängige Proliferation zeigten. So wurden im Proliferationstest A (Abb. 3.2 A, S. 53) überhaupt keine Unterschiede in der Proliferationsrate durch die unterschiedlichen Testsubstanzen deutlich. Im Proliferationstest B (Abb. 3.2 B) bewirkte E2 ebenfalls keine Steigerung der Proliferation der Zellen. Allerdings führte die Behandlung mit Fulvestrant unabhängig davon, mit welcher der Testsubstanzen es kombiniert wurde zu einer verringerten Proliferation (bei gleichzeitiger Behandlung mit 8PN nur andeutungsweise), was vermuten läßt, daß die Proliferationsrate nach dem Steroidentzug noch nicht auf das basale Niveau abgesunken war. Die Versuche A und B können daher keinen endgültigen Aufschluß über die Beeinflussung der Proliferationsrate durch die Naringenine und iCR geben. Bei den Versuchen C und D (Abb. 3.2 C und D) war jedoch eine östrogenabhängige Zunahme der Proliferation gegeben, sodaß diese für die Einschätzung der Wirkung der weiteren Testsubstanzen auf die Proliferation der HUVECs herangezogen werden konnten.

4.1.3 Differenzierungstest

Für den Matrigel-Test wurde ein Vorversuch mit 50000 Zellen/Well unternommen. Diese Zahl erwies sich als deutlich zu niedrig, da die zu erwartenden netzartigen Röhrenstrukturen nur Ansatzweise zu erkennen waren. Die Zahl der eingesetzten Zellen wurde daher für den eigentlichen Versuch deutlich auf 250000 Zellen/Well erhöht. Dies bewirkte auch in der Negativkontrolle schon eine recht deutlichen Ausbildung der Netzstruktur, was dazu führte, daß der Unterschied zur mit 10^{-8} M E2 behandelten Positivkontrolle nicht so deutlich wie erhofft ausfiel. Es ist daher wahrscheinlich, daß die Zellzahl in diesem Fall etwas zu hoch lag. Vermutlich liegt das Optimum bei ca. 200000 Zellen/Well einer 24-Well-Platte.

Weiterhin sollte beachtet werden, daß die Auswertung dieses Tests, so wie sie hier durchgeführt wurde, ähnlich einer immunohistochemischen Untersuchung, einer gewissen Subjektivität unterliegt. Zwar wurde versucht, repräsentative Ausschnitte der Zellkultur für das Foto auszuwählen, trotzdem ist die Auswahl des Ausschnittes eher subjektiv.

4.1.4 Tierversuche

Die Ovariectomie der Ratten bewirkt einen starken Rückgang des Uterusgewichts, welcher durch die anschließende Behandlung mit östrogen wirksamen Testsubstanzen rückgängig gemacht werden kann. Eine Zunahme des Uterusgewichts nach anschließender Behandlung mit einer Testsubstanz gilt daher als klassischer Indikator für die Östrogenität der Substanz (siehe Abschnitt 1.6.1, S. 11). Allerdings ist dies ein sehr grober Indikator. Viele Substanzen mit SERM-artigen Eigenschaften bewirken keinerlei Uterotrophie. Zusätzliche Genexpressionstudien sind daher notwendig, um ein breiteres Spektrum der möglichen östrogenen Effekte zu erfassen.

Der klassische, von der OECD validierte, uterotrophe Assay wird über einen Zeitraum von drei Tagen durchgeführt (62). Für den zweiten Tierversuch wurde daher auch eine maximale Behandlungszeit von drei Tagen gewählt. Der Verlauf der Expression vieler Gene zeigt jedoch, daß die maximale Wirkung sowohl von E2, als auch der Naringenine häufig schon früher, nach 24 h, oder gar nach 7 h erreicht wird. Dies gilt es insbesondere bei der Interpretation der Ergebnisse des Tierversuchs 2 zu beachten, da dieser als längerfristiger Versuch angelegt war, um Hinweise auf Wirkungen und Nebenwirkungen von iCR bei längerfristiger Einnahme zu gewinnen. Die Länge der Behandlung führte hier dazu, daß nur wenige signifikante Unterschiede in der Genexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten waren.

Die Vena cava und die Aorta wurden als repräsentative Organe für das Gefäßsystem entnommen. Zu beachten ist jedoch, daß durchaus Unterschiede in der Regulation der Genexpression und der Physiologie zwischen diesen Abschnitten und beispielsweise den Kapillargefäßen bestehen. Die Ergebnisse können also nicht unbedingt auf alle Abschnitte des Gefäßsystems übertragen werden.

Die RNA-Extraktion aus den Aorten war aufgrund des hohen Anteils glatter Muskulatur und der kleinen Gewebeproben recht schwierig. Die methodischen Schwierigkeiten sind wahrscheinlich auch ein Grund, weshalb die Ergebnisse der Genexpressionsmessung in den Aorten teilweise widersprüchlich sind. Der geringere Muskulaturanteil der Vena cava im Vergleich zur Aorta führt außerdem dazu, daß die dort ermittelten Expressionsdaten repräsentativer für das Endothel sind, als dies in der Aorta der Fall ist. Aufgrund dieser

Schwierigkeiten wurde vorerst auch von einer Messung des Genexpressionsmusters in den Aorten der Tiere des ersten Tierversuchs abgesehen.

Unter den in der Leber untersuchten Genen sind in erster Linie ApoA1 und Cyp7A1 für die Vorgänge im Gefäßsystem interessant (siehe Abschnitt 1.12.11 und 1.12.12, S. 31 ff.). Die Expression der Östrogenrezeptoren, sowie von Clu und C3 wurden gemessen, um die Wirksamkeit der Testsubstanzen auf die Leber der Versuchstiere in diesem Versuch zu zeigen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Der Rückgang des Östradiolspiegels während der Menopause verursacht bei den betroffenen Frauen oft unangenehme Folgeerscheinungen, wie Depressionen, Hitzewallungen und Schlafstörungen (236). Viele Frauen wünschen daher eine Therapie, die diese Symptome lindert. Andererseits bewirkt der Abfall des Hormonspiegels auch chronische Effekte, wie z.B. eine Abnahme der Knochendichte und -masse sowie eine starke Zunahme kardiovaskulärer Risiken. Außerdem werden nachlassende kognitive Fähigkeiten diskutiert, die eine solche Hormonersatztherapie ebenfalls sinnvoll erscheinen lassen (237). Die bisher vor allem angewandte Behandlung mit einer Kombination von Östrogen und Gestagen wird aufgrund neuerer klinischer Studien nur noch kurzzeitig zur Linderung akuter Wechseljahresbeschwerden durchgeführt (siehe Abschnitt 1.8, S. 13). Die Suche nach Alternativen stellt daher augenblicklich einen wichtigen Teil der medizinischen Forschung dar.

Eine geeignete Substanz sollte dabei drei wichtige Eigenschaften besitzen. Erstens muß sie E2-agonistisch auf Zielprozesse, z.B. Hitzewallungen und Zielgewebe, z.B. Knochen und Gefäßsystem wirken. Zum Zweiten sollte sie nicht oder E2-antagonistisch auf das Endometrium wirken, um eine Stimulation des Endometriums zu vermeiden und das Risiko zur Erkrankung an Endometriuskarzinomen nicht zu steigern. Drittens sollte sie nicht, bzw. antagonistisch auf die Brustdrüse wirken, um das Risiko für die Erkrankung an Mammakarzinomen nicht zu erhöhen (87). Diese Anforderungen verlangen von der Substanz die Eigenschaften eines SERMs (siehe Abschnitt 1.9.1, S. 15). Im Hinblick auf die hier untersuchten Substanzen pflanzlicher Herkunft kann man also sagen, daß das übergeordnete Ziel die Suche nach dem für die HRT idealen Phyto-SERM darstellt.

4.2.1 17 β -Östradiol

Die Behandlung mit E2 diente in allen Experimenten als Positivkontrolle für östrogene Effekte und, da zu E2 umfangreiches Datenmaterial aus der Literatur zur Verfügung steht, zur Evaluierung der Qualität der durchgeführten Versuche. Die gleichzeitige Behandlung mit dem Antiöstrogen Fulvestrant diente dem Nachweis eines ER-abhängigen Wirkmechanismus, da dieser durch Fulvestrant blockiert wird (siehe Abschnitt 1.9.2, S. 16).

Wirkung von E2 auf den Uterus

In beiden durchgeführten Tierversuchen bewirkt E2 erwartungsgemäß einen deutlichen uterotrophen Effekt (siehe Abb. 3.13, S. 72 und Abb. 3.7, S. 57), der durch gleichzeitige Behandlung mit dem Antiöstrogen Fulvestrant im Tierversuch 2 vollständig blockiert wird.

Dies zeigt zum Einen, daß das Ovariectomieren zu einem stark verringerten endogenen E2-Spiegel führt, und zum anderen wird deutlich, daß dieser uterotrophe Effekt ER-vermittelt ist.

Gleichzeitig kann man erkennen, daß die Expression der Proliferationsmarker KI67 und PCNA im Tierversuch 1 nach 24-stündiger Behandlung mit E2 ein Maximum erreicht (siehe Abb. 3.8, S. 59). Im Tierversuch 2 (Siehe Abb. 3.13, S. 72) wird deutlich, daß nach längerer Behandlungsdauer mit E2 das Uterusgewicht zwar weiterhin erhöht ist, die Expression der Proliferationsmarker sich jedoch wieder auf oder sogar leicht unter dem Niveau der Negativkontrolle befindet, d.h. es findet keine weitere Zunahme des Uterusgewichtes mehr statt.

Die Vaskularisierung des unter dem Einfluß von E2 während des Geschlechtszyklus der Ratte, des Menstruationszyklus des Menschen sowie auch unter dem Einfluß exogenen Östradiols während des Tierversuchs neugebildeten Uterusepithels, geht mit einer erhöhten Expression von VEGF und VEGFR2 einher (Siehe Abschnitt 1.12.7, S. 29). Dies war auch in diesen Experimenten der Fall. Die mRNA-Expression sowohl von VEGF als auch seines E2-regulierten Rezeptors VEGFR2 bei Behandlung mit E2 zeigt einen biphasischen Verlauf (Siehe Abb. 3.8, S. 59). Sie steigt zuerst stark an und erreicht ihr Maximum bereits sieben Stunden nach Beginn der E2-Behandlung. Nach 72 Stunden ist sogar eine leichte Hemmung der VEGF-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennbar. Auch im Tierversuch 2 bewirkte die Behandlung mit E2 nach 17 Tagen tendentiell eine Verringerung der VEGF-Expression. Es wird also deutlich, daß die Vaskularisierung des Uterusepithels unter dem Einfluß von E2 parallel zur Zunahme des Uterusgewichtes vor allem zu Beginn stattfindet und im weiteren Verlauf stagniert. Da die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant nach 17-tägiger Behandlung ebenfalls zu einer verringerten VEGF-Expression führt, ist zu vermuten, daß der Mechanismus, der zu einem Abklingen der E2-induzierten VEGF-Expression führt, nicht auf direkten ER-vermittelten Effekten beruht.

Auch die Expression der Östrogenrezeptoren im Uterus wurde durch die Behandlung mit E2 erwartungsgemäß herunterreguliert. Dieser Effekt ist bekannt (118) und unterstreicht die Aussagekraft der durchgeführten relativen mRNA-Quantifizierungen. Neu ist dabei, daß die Herunterregulation der mRNA-Expression von ER β wesentlich schneller und stärker erfolgt als diejenige von ER α (Siehe Abb. 3.8, S. 59). Da auch im 17-tägigen Tierversuch eine im Vergleich zur Negativkontrolle verringerte ER-mRNA-Expression beobachtet werden konnte (Siehe Abb. 3.14, S. 73), ist davon auszugehen, daß die Herunterregulation der ER-mRNA-Expression langanhaltend ist und wohl nicht biphasisch verläuft. Das hat zur Folge, daß möglicherweise alle weiteren ER-vermittelten Wirkungen östrogen wirkender Substanzen im zeitlichen Verlauf abgeschwächt werden, da die Zahl der für die Vermittlung des Signals zur Verfügung stehenden ERs abnimmt. Die Daten zum Tierversuch 2 zeigen für ER α auch, daß die Hemmung der Expression über die ER vermittelt wird, da die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant die Selbstregulation komplett inhibiert. Ansatzweise ist dies auch für den ER β zu beobachten, allerdings ist der Unterschied der ER β -mRNA-Expression nach E2-Behandlung mit und ohne Fulvestrant statistisch nicht signifikant.

Die Expression von Komplement C3 stellt besonders im Uterus einen guten Marker für östrogene Aktivität dar (siehe Abschnitt 1.12.2, S. 25). Dies zeigte sich auch in den hier durchgeführten Tierversuchen. Im Tierversuch 2 bewirkte die E2-Behandlung eine mehr als

100-fach stärkere C3-Expression. Wie die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant zeigt, ist sie ER-vermittelt, was aufgrund des dreifachen EREs im C3-Promotor auch zu erwarten ist und mit den Literaturwerten übereinstimmt (118, 126). Auch im zeitabhängigen Tierversuch war eine starke Stimulation der C3-Expression durch E2 meßbar. Hier zeigte sich, daß nach 24-stündiger Behandlungszeit ein Maximum der C3-Expression erreicht war.

Für Clusterin konnte im Uterus von Ratten eine ER-vermittelte Inhibierung gezeigt werden (147). Sowohl die Herunterregulation als auch der ER-vermittelte Wirkmechanismus konnte in den hier durchgeführten Tierversuchen bestätigt werden (siehe Abb. 3.14, S. 73 und Abb 3.9, S. 62).

Erwähnenswert ist auch die Tatsache, daß die Expression des Progesteronrezeptors in Übereinstimmung mit der Literatur (152) nach E2-Behandlung sehr schnell auf das Sechsfache ansteigt, um dann langsam wieder abzufallen. Im 17-tägigen Tierversuch wurde sogar eine gegenüber der Negativkontrolle verringerte PR-Expression gemessen. Da diese Inhibierung der PR-Expression unter das Niveau der Negativkontrolle auch bei gleichzeitiger Behandlung mit Fulvestrant auftrat, ist zu vermuten, daß diese Gegenreaktion zum kurzzeitigen Ansteigen der PR-Expression nicht ER-vermittelt ist, was hier jedoch nicht bewiesen werden kann, da im dreitägigen Tierversuch kein Fulvestrant eingesetzt wurde.

Die Wirkung von E2 sowohl auf den klassische Marker Uterotrophie, als auch auf die Genexpression im Uterus entsprach also weitestgehend den Erwartungen und deutet daher auf eine zuverlässige Messung der mRNA-Expression hin.

Wirkung von E2 auf das AhR-System im Uterus

Eine frühere Untersuchung von Chaffin *et al.* zeigte erstmals, daß die AhR-Expression sowohl im Ovar als auch in der Leber von Ratten im Verlaufe des Geschlechtszyklus Schwankungen unterworfen ist. Allerdings ließen daraufhin durchgeführte Antagonisierungsversuche mit E2 und Fulvestrant an juvenilen Ratten vermuten, daß dieser Effekt wohl nicht direkt E2-vermittelt ist, da weder E2 noch die Kombination von E2 und Fulvestrant zu einer veränderten AhR-mRNA-Expression in der Leber führte (202). Im Gegensatz dazu konnte hier deutlich gezeigt werden, daß E2 eine früh einsetzende Hemmung der AhR-mRNA-Expression im Uterus verursacht (Abb. 3.11, S. 66). Das schnelle Einsetzen (schon nach 7 h ist eine deutliche Herunterregulation der AhR-Expression meßbar) läßt zudem auf einen direkten ER-vermittelten Mechanismus schließen.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Expressionsdaten der dem AhR nachgeschalteten Gene CYP1A1, CYP1A2, GSTA2 und NMOR zeigen, daß E2 offenbar auf die Expression einiger dieser Gene einen direkten Einfluß ausübt. So läßt sich starke Stimulation der Expression von GSTA2 nach E2-Behandlung nicht über den Einfluß von E2 auf die AhR-Expression erklären. Auch der Anstieg der Expression von Cyp1A2 ist wahrscheinlich nicht darauf zurückzuführen, da der aktivierte AhR einen stimulierenden Effekt auf die Expression dieser Gene ausübt, die AhR-Expression jedoch aufgrund der E2-Behandlung gesunken ist.

Einzig für die beobachtete Hemmung der CYP1A1-mRNA-Expression käme eventuell eine Vermittlung durch die Regulation der AhR-Expression in Frage, da die Regulation hier gleichgerichtet zur Regulation der AhR-Expression ist. Allerdings ist auch diese Annahme nicht wahrscheinlich, da für diesen Fall eine zeitliche Verzögerung zu erwarten wäre, die

Expression von CYP1A1 jedoch schon nach 7 h sehr ausgeprägt ist und ihr Maximum erreicht hat.

Besonders interessant ist der enorm starke Anstieg der GSTA2-Expression im Uterus der Ratten, der so bisher nicht beschrieben wurde. Die starke Induktion kommt vor allem dadurch zustande, daß die basale Expression dieses Gens im Uterus nahe null liegt.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß aufgrund von Protein-Protein-Interaktionen zwischen ER α und AhR eine Verstärkung des AhR-Wegs durch E2 stattfindet (238). Zwar ist der primäre endogene Ligand des AhR bisher nicht bekannt, trotzdem ist eine konstitutive Aktivität des AhR nachgewiesen (239) und es wurden verschiedene endogene Substanzen gefunden, welche den AhR aktivieren können (240–242). Die hier gemessene Regulation der Expression AhR-regulierter Gene nach E2-Behandlung könnten also auf diesen zweiten Effekt durch eine Verstärkung der basalen konstitutiven AhR-Aktivität über eine Aktivierung des ER zurückzuführen sein. Andererseits wäre auch ein AhR-unabhängiger Mechanismus denkbar. Da jedoch gleich mehrere Zielgene des AhR-Wegs betroffen sind, ist diese Variante nicht wahrscheinlich.

Die hier gezeigten Wirkungen von E2 auf die Genexpression von AhR und auf die Expression AhR-regulierter Gene im Uterus stellen somit komplementäre Wege der Interaktion zwischen E2 und dem AhR-Weg dar. Da eine Herunterregulation der AhR-Expression festgestellt werden konnte, wirkt dieser Mechanismus der, wie auch hier gezeigt, insgesamt verstärkenden Wirkung von E2 auf die Dioxin-induzierbare AhR-Aktivität entgegen.

Wirkung von E2 auf das Gefäßsystem

Erste Hinweise für die Wirkung auf das Gefäßsystem sollten die *in vitro*-Versuche mit den HUVECs liefern. Wie bereits in der Diskussion der Methoden (siehe Abschnitt 4.1.1) erwähnt, ist die proliferationsfördernde Wirkung von E2 auf HUVEC abhängig von den verwendeten Zellen und eventuell weiteren Faktoren, wie der Ausbeute bei der Isolierung der Zellen aus den Nabelschnurvenen.

Die Proliferationstests C und D zeigen, daß die proliferationsfördernde Wirkung von E2 auf die Endothelzellen ER-vermittelt ist, da in beiden Versuchen die zusätzliche Behandlung mit Fulvestrant den deutlichen Anstieg der Proliferation bei alleiniger Behandlung mit E2 verhindert. Gleichzeitig bewirkt E2 jedoch nicht nur eine stärkere Proliferation der Endothelzellen, sondern – unter geeigneten Bedingungen – auch eine Differenzierung dieser Zellen, wie der Matrigel Test (Abb. 3.3, S. 55) zeigt. Bei diesem Test wurde auch die konzentrationsabhängige Wirkung überprüft. Im Vergleich zur EtOH-behandelten Negativkontrolle wird deutlich, daß die wirksamste Konzentration bei 10^{-8} M E2 liegt, was auch mit unseren Erfahrungen in anderen Tests, wie dem MVLN-Test und dem Glaxo-Hefe-Test, übereinstimmt (110).

Viele der untersuchten Gene zeigten in der Vena cava keine veränderte Expression nach E2-Behandlung über 24 h (Abb. 3.12, S. 68). Die mRNA-Expression von ER α wurde jedoch erwartungsgemäß herunterreguliert, was zeigt, daß trotz schwieriger mRNA-Extraktion aus den Gefäßen die Messungen recht zuverlässig sind. Es wird allerdings in diesem Fall keine Zeitabhängigkeit deutlich. Die meisten anderen untersuchten Gene weisen in der Vena cava eine biphasische Regulation ihrer Expression auf. So bewirkt die E2-Behandlung eine kurzzeitige Inhibierung der Clu-Expression, die nur nach 24-stündiger Behandlung signifikant ist und nach drei Tagen nicht mehr feststellbar ist. Auch im zweiten Tier-

versuch war nach 17 Tagen nur eine sehr leichte Inhibierung der Clu-mRNA-Expression meßbar. Diese war durch die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant inhibierbar, was analog zur E2-vermittelten Regulation der Clu-mRNA-Expression im Uterus auf einen ER-vermittelten Mechanismus hindeutet.

Erstaunlich ist das Ergebnis der Messung der mRNA-Expression des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF und dessen Rezeptors VEGFR2 in der Vena cava. VEGF zeigte im Tierversuch 1 nach 24-stündiger Behandlung mit E2 überhaupt keine veränderte Expressionsrate im Vergleich zur Negativkontrolle und die Expression von VEGFR2 ist nur nach 24-stündiger Behandlung stark hochreguliert, während eine kürzere oder längere Behandlungszeit sogar zu einer verringerten VEGFR2-Expression führten. Auch im Tierversuch 2 wird die Expression dieser beiden Gene in der Vena cava durch E2 nicht signifikant reguliert. Diese Ergebnisse entsprechen am ehesten dem kurzzeitigen auch im Uterus beobachteten Effekt von E2 auf die VEGF- und VEGFR2-Expression.

Offenbar ist das E2-abhängige Wachstum von endometrialen und Mammakarzinomen zum Teil auf eine verstärkte Vaskularisierung des Tumors unter E2-Einfluß zurückzuführen (177, 243, 244). Da die Entwicklung eines Tumors jedoch ein langandauernder Prozeß ist, ist es fraglich, ob die höhere Brustkrebsrate während einer postmenopausalen HRT auf solch kurzfristige Effekte zurückzuführen sein kann. Möglicherweise unterscheidet sich also der VEGF- oder VEGFR2-Expressionsverlauf nach E2-Behandlung in Mamma- und Endometriumskarzinomen von dem, welcher hier sowohl im gesunden Uterus, als auch in der Vena cava ermittelt wurde. Für das E2-abhängig wachsende Endometriumskarzinom konnte in zwei Fällen bereits gezeigt werden, daß VEGF zwar basal exprimiert war, jedoch nicht E2-abhängig reguliert wurde und VEGF-Expression daher keinen Mechanismus darstellt, durch den E2 seinen wachstumsfördernden Effekt auf endometriale Tumoren ausübt (245, 246).

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsmessung nach E2-Behandlung in der Aorta im Tierversuch 2 machen deutlich, daß die Schwierigkeiten bei der Präparation der mRNA aus diesem Organ sich wohl auch auf die Genauigkeit der Meßwerte auswirken. In vielen Fällen sind die Meßwerte schwer zu interpretieren. So ergaben die Messungen für die Expression von ER α in der Aorta eine verringerte Expression nach E2-Behandlung, allerdings auch nach der Behandlung mit Fulvestrant bzw. bei der kombinierten Behandlung mit E2 und Fulvestrant. Dieses Ergebnis entspricht nicht dem gängigen Schema für die ER-vermittelte Regulation der ER-mRNA-Expression und birgt Zweifel an der Zuverlässigkeit der Meßwerte.

Auch die meisten anderen der in der Aorta auf ihre Expression untersuchten Gene lassen keine klare E2-abhängige Regulation erkennen. Dies könnte entweder auf die lange Behandlungszeit von 17 Tagen zurückzuführen sein oder aber ebenfalls durch Meßfehler bedingt sein. Diese Ergebnisse wecken ebenfalls Zweifel an der Korrektheit der nach Behandlung mit iCR in der Aorta gewonnenen Ergebnisse.

Daß die ER α -mRNA-Expression in der Leber im Gegensatz zu der im Uterus hochreguliert wird, entspricht den Literaturdaten anderer Tierversuche (247) und bestätigt die Korrektheit der durchgeführten Messungen. Auch hier kann der Effekt durch Fulvestrant inhibiert werden (Siehe Abb. 3.19). Dieses Ergebnis ist ein deutliches Indiz dafür, daß die Leber der Versuchstiere erwartungsgemäß östrogener Kontrolle unterliegt.

Für das Gefäßsystem von Bedeutung ist jedoch in der Leber vor allem die Expression von ApoA1 und Cyp7A1. Gut zu sehen ist die ER-vermittelte Hochregulation der

mRNA-Expression des HDL-Strukturproteins ApoA1, die laut Literatur zu einem höheren HDL/LDL-Verhältnis führt und damit den Rücktransport von Cholesterin in die Leber begünstigt (66). Wenngleich dieser Effekt nicht neu ist, so macht der Tierversuch doch deutlich, daß die Hochregulation von ApoA1 auch über längere Zeiträume anhält und unterstreicht somit die Relevanz der E2-abhängigen Regulation der ApoA1-mRNA für die atheroprotektive Wirkung des E2. Gleiches gilt für die mRNA-Expression des Cyp7A1. Die Daten lassen eine deutliche ER-vermittelte Hochregulation der Cyp7A1-mRNA nach E2-Behandlung erkennen. Dieser Effekt ist bekannt, bisher gab es aber keine Daten, die zeigten, daß die Regulation auch über einen längeren Zeitraum anhält. Die resultierende höhere Cyp7A1-Aktivität führt zu einem schnelleren Abbau des Cholesterins.

4.2.2 8PN

Das Interessante an 8PN ist seine im Vergleich zu anderen Phytoöstrogenen besonders starke östrogene Wirkung, die offenbar hauptsächlich über den ER α vermittelt wird (Abschnitt 1.11.2, S. 23). Allerdings gab es bisher keine Daten über die Zeitabhängigkeit der Wirkung im Uterus. Weiterhin lagen bisher keine Daten über die Wirkung auf das Gefäßsystem vor. Obwohl es offenbar keine SERM-Eigenschaften besitzt, sondern eine E2-agonistisch wirkende Substanz darstellt, ist seine Untersuchung aufschlußreich, da es als nicht toxischer Inhaltsstoff des Hopfens in Form von Arzneimitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, Nahrungsbestandteilen und Kosmetika vom Menschen häufig aufgenommen wird.

Wirkung von 8PN auf den Uterus

Auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß es sich bei 8PN um ein starkes Phytoöstrogen mit rein östrogenen Wirkung handelt. Als einzige der hier untersuchten Testsubstanzen zeigt 8PN eine uterotrophe Wirkung (Abb. 3.7, S. 57). Dies ist ein starkes Indiz für Östrogenität. In der hier eingesetzten Konzentration war diese ähnlich stark ausgeprägt, wie die von E2. Die deutlich erhöhte Expression der Proliferationsmarker bestätigen die östrogene Wirkung von 8PN auf den Uterus (Abb. 3.9, S. 62). Der zeitliche Verlauf der Expressionsrate sowohl von KI67 als auch von PCNA entspricht dem nach Behandlung mit E2. Eine Vaskularisierung des Uterusepithels scheint, wenn man die Expression von VEGF zu Grunde legt, durch 8PN ebenfalls ausgelöst zu werden. Auch hier entspricht der zeitliche Verlauf weitestgehend dem, welcher nach Behandlung mit E2 beobachtet werden kann. Tendenziell gilt dies auch für VEGFR2, wobei die Ergebnisse nach 8PN-Behandlung statistisch nicht signifikant sind. Der für Phytoöstrogene ungewöhnlich starke uterotrophe Effekt unterstützt die These, daß 8PN ein ER α -selektiver Agonist ist, da proliferative Effekte östrogenen Substanzen im Uterus wohl vor allem durch ER α vermittelt werden (248).

Auch die Expressionsmuster aller weiteren untersuchten Gene im Uterus lassen auf eine E2-agonistische Wirkung von 8PN schließen (Abb. 3.8, S. 59). Besonders eindrucksvoll dabei ist, daß neben der Richtung der Regulation der Genexpression im Uterus auch der zeitliche Verlauf meist exakt dem nach Behandlung mit E2 beobachteten entspricht. Das Ausmaß der Regulation war in einigen Fällen ähnlich dem nach E2-Behandlung. In anderen Fällen war es etwas geringer. Dabei ist jedoch zu beachten, daß die verabreichte

8PN-Dosis wesentlich höher war als die E2-Dosis.

Die starke östrogene Wirkung von 8PN auf den Uterus läßt einen alleinigen Einsatz von 8PN zur Behandlung oder Vorbeugung von postmenopausalen Beschwerden fraglich erscheinen. Eines der Hauptkriterien dabei sollte eine weitgehende Unwirksamkeit im Uterus sein, um eine Proliferation des Uterusepithels zu vermeiden sowie auch das Risiko der Erkrankung an einem endometrialen Karzinom nicht unnötig zu erhöhen. Eventuell wäre jedoch, ähnlich wie bei der klassischen HRT, eine gleichzeitige Behandlung mit Progestinen denkbar, um eine Stimulation des Endometriums durch 8PN zu verhindern (siehe auch (249)).

Wirkung von 8PN auf das AhR-System im Uterus

Die Expression von AhR wird im Uterus durch 8PN genau wie durch E2 gehemmt, was vermutlich auf die bereits beschriebene östrogene Wirkung von 8PN zurückzuführen ist.

Für eine Reihe von Flavonoiden, darunter Naringenin konnte eine antagonistische Wirkung auf die Aktivierung des AhR *in vitro* festgestellt werden (204). Für 8PN wurde dies jedoch bisher noch nicht getestet. Da jedoch eine Vielzahl von Flavonoiden diesen Effekt zeigt, ist auch für 8PN zusätzlich zu den östrogenen Wirkungen auf das AhR-System eine AhR-antagonistische Wirkung denkbar.

Das Expressionsmuster der AhR-regulierten Gene nach Behandlung mit 8PN ähnelt jedoch stark dem nach Behandlung mit E2. Wie in Abschnitt 4.2.1, S. 90 beschrieben, kommen für die E2-abhängige Wirkung auf die Expression AhR-regulierter Gene verschiedene Wege in Frage, beispielsweise die Regulation der AhR-Expression, die Stimulation AhR-abhängiger Genexpression durch Protein-Protein-Interaktionen zwischen aktiviertem AhR und aktiviertem ER, sowie die direkte Regulation durch klassische Wirkmechanismen des E2, die bisher jedoch noch in keinem Fall gezeigt werden konnte. Da 8PN ein starkes Phytoöstrogen darstellt, sind diese Wege grundsätzlich auch für die 8PN-abhängige Regulation dieser Gene denkbar. Die Ähnlichkeit der Expressionsmuster nach E2- und nach 8PN-Behandlung läßt vermuten, daß diese östrogenen Wege der Genregulation hauptsächlich für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. Sollte also zusätzlich ein AhR-antagonistischer Effekt von 8PN bestehen, so scheint dieser zumindest ohne das Vorhandensein exogener AhR-Liganden nicht ausschlaggebend für die Regulation der untersuchten Gene zu sein.

Wirkung von 8PN auf das Gefäßsystem

Im Proliferationstest mit HUVECs wurde keine östrogene Wirkung von 8PN deutlich (Abb. 3.2 C und D, S. 53). Es war kein Unterschied in der resultierenden Proteinmenge nach Behandlung mit 8PN im Vergleich zur Negativkontrolle vorhanden. Offenbar kann 8PN sogar die proliferationsfördernde Wirkung von E2 hemmen. Pepper *et al.* beschreiben jedoch eine allgemein proliferationshemmende Wirkung von 8PN (250), sodaß hier nicht zwingend eine antiöstrogene Wirkung vorliegt.

Im Differenzierungstest ist dagegen eine konzentrationsabhängige ER-vermittelte östrogene Wirkung sichtbar. Die Ausbildung der Netzstrukturen nimmt von der Negativkontrolle über 10^{-7} M 8PN und 10^{-6} M 8PN deutlich zu, während die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant die Wirkung von 8PN auf die Differenzierung offensichtlich blockiert. Eine

additive Wirkung von 8PN und E2 scheint jedoch zumindest in den untersuchten Konzentrationen nicht gegeben zu sein. Vermutlich ist das Plateau der Dosis-Wirkungs-Kurve bei der Behandlung mit 10^{-8} M E2 bereits erreicht, sodaß eine höhere Dosis östrogen wirkender Substanzen keinen zusätzlichen Effekt mehr verursacht.

Sieht man sich die Regulation der untersuchten Gene nach 8PN-Behandlung in der Vena cava an, so ist auch hier ein weitestgehend dem nach E2-Behandlung entsprechendes Regulationsmuster vorhanden. Man kann also auch in der Vena cava von einer rein östrogenen Wirkung von 8PN ausgehen. Es ist schwer zu sagen, wieso zwar ein Effekt auf die Differenzierung analog dem von E2 existiert, aber kein proliferativer Effekt nachgewiesen werden konnte. Eventuell überdeckt der oben beschriebene antiangiogene Effekt die E2-agonistische Wirkung von 8PN in Bezug auf die Proliferation von HUVECs. Möglicherweise war jedoch auch der Proliferationstest, so wie er hier durchgeführt wurde nicht sensitiv genug, zumal die Expressionsdaten von VEGF und VEGFR2 im Uterus zeigen, daß 8PN *in vivo* zumindest im Uterus eine angiogene Wirkung besitzt (Abb. 3.9, S. 62). Eine zusätzliche Messung der Expression von Proliferationsmarkern und VEGF in HUVECs könnte dies aufklären.

4.2.3 6DMAN

6DMAN wurde in die HUVEC-basierten Versuche und in den Tierversuch 1 einbezogen, weil bereits sehr interessante *in-vitro*-Daten aus MVLN-Zellen und dem Glaxo-Hefe-Test vorlagen (110). Eine Wiederholung dieser Tests erübrigte sich deshalb. Insbesondere der MVLN-Test ließ eine relative starke östrogene Wirkung von 6DMAN vermuten.

Wirkung von 6DMAN auf den Uterus

Obwohl 6DMAN im Gegensatz zu E2 und 8PN keine uterotrophe Wirkung zeigt (Abb. 3.7, S. 57), unterstützen die Genexpressionstudien im Uterus der Ratten teilweise die Vermutung, daß 6DMAN eine östrogene Wirkkomponente besitzt (Abb. 3.8, S. 59 und Abb. 3.9, S. 62). Interessanter Weise zeigen dabei die untersuchten Gene, welche ein oder mehrere EREs im Promotor besitzen, ein Expressionsmuster, welches dem durch Behandlung mit E2 gemessenen Muster entspricht. Es handelt sich dabei um $ER\alpha$ und $ER\beta$, sowie um C3. Auffällig ist auch, daß die Stimulation der Expression von C3 beinahe ebenso deutlich ist, wie nach E2-Behandlung. 6DMAN ist also bezüglich der Expression dieses Gens ein noch potenteres Phytoöstrogen als 8PN. Die Expression aller weiteren untersuchten Gene wurde im Gegensatz zur Positivkontrolle E2 nicht durch die Behandlung mit 6DMAN beeinflusst. Dies betrifft die über nicht-klassische Mechanismen regulierten Gene Clu, PR, und COX2 sowie auch die Uterotrophie- und Vaskularisierungs-assoziierten Gene PCNA, KI67, VEGF und VEGFR2.

Über die Ursache dieses Phänomens kann hier nur spekuliert werden, zumal die Anzahl der untersuchten Gene für eine sichere Aussage wohl nicht ausreicht. Bekannt ist, daß unterschiedliche Liganden eine veränderte Konformation der terminalen Helix 12 des Östrogenrezeptors verursachen können, was zu einer veränderten Kofaktorrekutierung führt (siehe Abschnitt 1.5.4 auf Seite 8). Für die Interaktion mit dem Jun-Protein, welches als Fos/Jun-Heterodimer an AP-1-Elemente bindet, wird beispielsweise vermutet, daß diese auf der Interaktion verschiedener Koregulatoren mit dem ER einerseits und dem

Jun/Fos-Komplex andererseits beruht (251). Aufgrund der Komplexität der Regulation der Transkription dieser Gene ist es jedoch auf der Basis der hier gewonnenen Daten nicht möglich, ein detaillierteres mechanistisches Modell zu entwerfen, das das beobachtete Expressionsmuster erklären könnte. Entsprechende Untersuchungen wären jedoch sicher lohnenswert.

Wirkung von 6DMAN auf das AhR-System

Wenngleich für einige Flavonoide eine AhR-antagonistische Wirkung gezeigt werden konnte, scheint 6DMAN nur eine sehr schwache Wirkung auf die Expression AhR-regulierter Gene zu besitzen (Abb. 3.11, S. 66). Auch auf die Expression des AhR selbst hat 6DMAN keine Wirkung. Dies unterstreicht nochmals die Hypothese, daß 6DMAN nur auf die Expression E2-sensitiver Gene eine Wirkung besitzt, welche in ihrer Promotorregion ein ERE besitzen und daher in ihrer Expression über den klassischen ER-vermittelten Weg reguliert werden.

Wirkung von 6DMAN auf das Gefäßsystem

Im Gegensatz zur Wirkung im Uterus ist die Wirkung von 6DMAN auf das Gefäßsystem bezüglich der Genexpression fast rein östrogen (Abb. 3.12, S. 68). Lediglich bei der Expression von VEGFR2 zeigt sich ein geringer Unterschied zwischen den Expressionsmustern nach E2-Behandlung und nach 6DMAN-Behandlung. Die kurzzeitige Stimulation der VEGFR2-mRNA-Expression durch E2 nach 24-stündiger Behandlung tritt nach Behandlung mit 6DMAN nicht auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten aus dem Proliferationstest und dem Differenzierungstest mit HUVECs ergeben ein gemischtes Bild bezüglich der Östrogenität von 6DMAN im Gefäßsystem. Wie auch iCR und 8PN zeigte 6DMAN keine proliferationsfördernde Wirkung auf HUVECs und konnte die proliferative Wirkung von E2 hemmen, was auf eine eher antiöstrogene Wirkung bezüglich der Proliferation von Endothelzellen hinweist (Abb. 3.2, S. 53). Allerdings scheint 6DMAN stimulierend auf die Differenzierung dieser Primärzellen im Matrigeltest zu wirken (Abb. 3.4, S. 55). Daß dabei keine Konzentrationsabhängigkeit erkennbar ist, könnte den im Abschnitt 4.1.3 auf Seite 87 beschriebenen Einschränkungen des Differenzierungstests zuzuschreiben sein. Auch die gleichzeitige Behandlung mit 10^{-6} M 6DMAN und 10^{-8} M E2 konnte den Effekt nicht sichtbar steigern. Die gleichzeitige Behandlung mit Fulvestrant scheint die differenzierungsfördernde Wirkung von 6DMAN zu inhibieren, wenngleich dies in der Abbildung ebenfalls nur wenig deutlich wird (Siehe Abb. 3.4, S. 55).

Möglicherweise besitzt 6DMAN also aufgrund seiner E2-agonistischen Wirkung auf die Genexpression in der Vena cava eine protektive Wirkung auf das Gefäßsystem. Wichtig in diesem Zusammenhang ist jedoch auch, daß 6DMAN im Gegensatz zu E2 offenbar keine angiogene Wirkung besitzt, wie sowohl die Expressionsdaten von VEGF und VEGFR2 im Uterus, als auch die *in vitro*-Daten zeigen. Daraus könnte sich eine weniger ausgeprägte Förderung des Tumorwachstums resultieren, als dies bei E2 der Fall ist, dessen wachstumsfördernde Wirkung auf Mamma- und Endometriumskarzinom teilweise auf angiogene Effekte zurückzuführen ist (177, 243, 244).

4.2.4 7OPN

Wirkung von 7OPN *in vitro*

Da über 7OPN bisher praktisch keine Daten vorlagen, wurden zuerst ein *in vitro*-Screening mittels des MVLN-Tests und des Glaxo-Hefe-Tests durchgeführt. Während der E2-induzierbare Hefe-Test keinen östrogenen Effekt anzeigte (Daten nicht gezeigt), ließ der MVLN-Test auf eine leicht antiöstrogene Wirkung bei niedriger Dosis schließen, da diese im Gegensatz zu E2 zu einer leicht verringerten Luziferase-Aktivität führten (Abb. 3.1A), S. 52A). Daher wurde zusätzlich noch getestet, ob 7OPN die aktivierende Wirkung von E2 inhibieren kann. Abb. 3.1B, S. 52 zeigt daß dies zwar der Fall ist, allerdings ist die inhibierende Wirkung wesentlich schwächer, als diejenige des reinen Antiöstrogens Fulvestrant. Bei sehr hohen Dosen konnte jedoch eine deutlich östrogene Wirkung gezeigt werden, die auch durch Fulvestrant inhibierbar ist (Abb. 3.1A), S. 52). Dies deutet darauf hin, daß 7OPN zwar eine vergleichsweise hohe Affinität zum ER α besitzt, jedoch nur eine schwache transaktivierende Wirkung besitzt, welche daher erst bei höheren Konzentrationen wirksam wird.

Wirkung von 7OPN auf den Uterus

Die interessanten Ergebnisse aus dem MVLN-Transaktivierungs-Test führten zu der Überlegung, 7OPN auch im Rahmen des Tierversuchs 1 einzusetzen, um seine Wirkung *in vivo* zu testen. Allerdings wurde aufgrund der geringen vorhandenen Substanzmenge vorerst keine Zeitabhängigkeit der Wirkung bestimmt, sondern nur ein klassischer dreitägiger uterotropher Assay durchgeführt. Es zeigte sich, daß 7OPN in der eingesetzten Dosis keine uterotrophe Wirkung auf die Ratten besitzt.

Bei der anschließenden Messung der Genexpression im Uterus ist zu beachten, daß die angegebenen Meßwerte für die E2-behandelte Postivkontrolle denen des 72 h-Zeitpunktes der zeitabhängigen Genexpressionsmessung entspricht. Die Ergebnisse der Messung der uterinen C3-Expression unterstützen dabei die Hypothese, daß 7OPN unter Umständen antiöstrogene Eigenschaften besitzt. Die drei EREs im Promotor-Bereich von C3 machen dieses Gen zu einem besonders sensitiven Marker östrogenen Wirkung. Diese hohe Sensitivität ermöglicht offenbar eine erhöhte basale Expression von C3 aufgrund des niedrigen noch vorhandenen Östrogenspiegels nach der Ovariectomie im Uterus der Ratte. Diese basale C3-Expression wurde durch die Behandlung mit 7OPN nochmals gesenkt. Allerdings gibt es auch Expressionsmuster anderer Gene, die eher auf eine östrogen-agonistische Wirkung in bestimmten Zusammenhängen hindeuten. So war sowohl nach 7OPN-Behandlung als auch nach E2-Behandlung die mRNA-Expression von ER β herunterreguliert. Der zeitliche Verlauf der PR-mRNA-Expression nach E2-Behandlung zeigt eine Hochregulation, die ihr Maximum bereits nach 24 h erreicht. Nach 72 h jedoch lag der Wert der PR-mRNA-Expression wieder nahe der Grundexpression. 7OPN verursachte eine starke Hochregulation der PR-Expression nach 72-stündiger Behandlung, was möglicherweise auf eine verzögerten Antwort auf die 7OPN-Behandlung im Vergleich zur E2-Behandlung zurückzuführen ist.

Die dargestellten Auswirkungen von 7OPN auf die uterine Genexpression in Ratten legen den Schluß nahe, daß der Dosisbereich, in dem 7OPN E2-agonistisch bzw. -antagonistisch wirkt stark kontextabhängig ist. Vorstellbar sind dabei Abhängigkeiten von Dosis,

Wirkdauer, Regulationsmechanismus des Zielgens, Zielorgan, Zielgewebe u.a. Interessanter Weise scheint 7OPN jedoch trotz deutlicher Wirkung auf die Expression östrogen regulierter Gene keine uterotrophe Wirkung zu besitzen. Dies macht 7OPN zu einem SERM bezüglich verschiedener Endpunkte im Uterus der Ratte. Wichtig wäre in diesem Zusammenhang noch die Untersuchung weiterer Zielorgane, Zeitpunkte und Dosen, um die SERM-Eigenschaften von 7OPN genauer zu charakterisieren und seine mögliche Eignung für die HRT abschätzen zu können.

4.2.5 iCR

Da iCR schon seit langem in der Behandlung postmenopausaler Beschwerden eingesetzt wird und die Wirksamkeit in einer Reihe von Studien belegt werden konnte (siehe Abschnitt 1.11.1, S. 19), dienten die hier durchgeführten Versuche in erster Linie der Abschätzung der Wirksamkeit und Sicherheit bei längerfristiger Einnahme und der Prüfung auf eventuell vorliegende östrogene Wirkmechanismen. Es wurde daher eine deutlich längere Versuchsdauer als im üblichen dreitägigen Uterotrophietest gewählt. Die Dauer des durchgeführten Tierversuchs (Tierversuch 2) war in erster Linie von der Verfügbarkeit größerer Mengen Fulvestrant begrenzt und belief sich auf 17 Tage.

Wirkung von iCR auf den Uterus

Im *in vivo*-Test in ovariectomierten Ratten zeigt sich beim Vergleich der durchschnittlichen Uterusgewichte, daß iCR keine uterotrophe Wirkung besitzt. Da die Expression der Proliferationsmarker nach 17-tägiger E2-Behandlung sogar unter das Niveau der Expression in den unbehandelten Tieren gesunken war, lassen sich durch ihre Expressionsdaten nach iCR-Behandlung keine zusätzlichen Erkenntnisse bezüglich des uterotrophen Potentials von iCR gewinnen.

Der Einfluß von iCR auf die Expression aller weiteren im Uterus untersuchten Gene ist im Vergleich zu E2 relativ gering. In bereits veröffentlichten *in vitro*-Experimenten (MVLN-Test und Glaxo-Hefe-Test) zeigte der isopropanolische *Cimicifuga racemosa*-Extrakt eine deutlich antiöstrogene, aber keinerlei östrogene Wirkung (110). Auch die in dieser Arbeit gemessene uterine Expression der sensitiven Markergene für östrogene Wirkung C3 und ER α unterstützen diese These. Während die Expression von C3 nach der E2-Behandlung stark erhöht ist, führt iCR zu einer Hemmung der C3-mRNA-Expression, vergleichbar zur Regulation, welche nach der Behandlung mit Fulvestrant beobachtet werden kann. Nach E2-Behandlung war erwartungsgemäß eine Hemmung der ER α -Expression zu beobachten. Dagegen führte die Behandlung mit iCR zu einer leicht erhöhten ER α -mRNA-Expression, ebenfalls vergleichbar dem Ergebnis nach der Behandlung mit Fulvestrant.

Da die Expression aller weiteren untersuchten Gene keine Regulation durch iCR zeigte, kann man schließen, daß iCR bezüglich aller bisher untersuchten Marker keine östrogene Wirkung auf den Uterus besitzt. Darüber hinaus existieren inzwischen einige Hinweise, die auf eine leicht antiöstrogene Wirkung von iCR bezüglich einiger Marker sowohl *in vitro* als auch im Uterus der untersuchten Ratten hindeuten. Eine längerfristige Anwendung von iCR zur Vorbeugung von menopausalen Beschwerden scheint also gemäß aller bisher gewonnenen Erkenntnisse sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch von anderen Ar-

beitsgruppen aufgrund der fehlenden östrogenen Wirkung bzw. einer leicht antiöstrogenen Wirkung keine negativen Auswirkungen auf den Uterus in Form einer proliferativen Veränderung des Endometriums oder einer Erhöhung des Risikos für endometriale Karzinome zu haben.

Wirkung von iCR auf das Gefäßsystem

Auch im hier durchgeführten Proliferationstest mit HUVECs zeigte iCR keine proliferationsfördernde Wirkung, die eine östrogene Aktivität hätte vermuten lassen können (siehe Abb. 3.2, S. 53). Weiterhin hemmt iCR die proliferationsfördernde Wirkung von E2 teilweise, was wiederum eine leicht antiöstrogene Wirkung von iCR nahelegt. Die Ergebnisse des Differenzierungstests (Abb. 3.6, S. 57) hingegen lassen eine differenzierungsfördernde, der Wirkung von E2 gleich gerichtete, Wirkung des auf 1 µg/ml verdünnten iCR vermuten. Die um den Faktor 10 höhere iCR-Konzentration führt jedoch zu einer geringeren Ausbildung netzförmiger Röhrenstrukturen der HUVECs auf Matrigel, als es in der Negativkontrolle der Fall ist. Da auch die gleichzeitige Behandlung mit E2 und iCR zu einer geringer ausgeprägten Differenzierung als dies bei den nur mit E2 behandelten Zellen der Fall ist führt, könnte dies entweder auf eine antiöstrogene Wirkung des iCR zurückzuführen sein, wie sie ja auch in anderen Tests beobachtet wurden (100), oder aber erste Hinweise toxischer Effekte des iCR darstellen, die bei 10^{-3} -facher Konzentration zum Zelltod der HUVECs führen (Daten nicht gezeigt).

Auch bezüglich der Genexpression in der Vena cava konnte praktisch kein Effekt von iCR gemessen werden. Zwar findet eine leichte Hochregulation der Expression von C3 statt, da dieses Gen aber in der Vena cava nicht E2-reguliert ist, wie auch die hier durchgeführten Messungen zeigen, kann nicht von einem östrogenen Effekt von iCR ausgegangen werden. Weiterhin ist die nur 1,5-fache Änderung der C3-Expression sehr gering (im Uterus bewirkt E2 eine mehr als 100-fache Stimulation der C3-Expression), sodaß dem Meßwert wohl keine größere Bedeutung eingeräumt werden muß.

Auf die Expression aller in der Leber untersuchten Gene hat iCR keine nennenswerte Wirkung. Zumindest über die Steuerung der Expression von ApoA1 und Cyp7A1 scheint iCR also keinen Effekt auf den Lipidspiegel im Blut zu haben. Dabei muß jedoch beachtet werden, daß bisher noch keine Daten zur kurzzeitigen Wirkung auf die Expression dieser Gene in der Leber vorliegen.

Zwar wurde nur die Langzeitwirkung von iCR auf die Genexpression im Gefäßsystem untersucht und die in der Aorta gewonnenen Daten erscheinen aufgrund der für die Positivkontrolle ermittelten Werte eher unzuverlässig (Abb. 3.17, S. 78 und Abb. 3.18, S. 79), trotzdem wird deutlich, daß iCR bezüglich der Expression E2-regulierter Gene keinen relevanten Einfluß auf das Gefäßsystem zu haben scheint. Die im Gegensatz zu E2 ebenfalls nicht vorhandene proliferationsfördernde Wirkung von iCR auf HUVECs deutet ebenfalls daraufhin, daß iCR zwar keine kardioprotektive Wirkung zu besitzen scheint, aber wohl auch nicht mit schwerwiegenden Nebenwirkungen zu rechnen ist, zumal auch die langjährige Anwendung bei postmenopausalen Frauen bisher keine Anhaltspunkte dafür bot.

4.2.6 Schlußfolgerungen und Ausblick

Ein ideales Phyto-SERM, das prinzipiell in der HRT anwendbar ist, muß die oben genannten Anforderungen erfüllen: antagonistische hormonelle Wirkung oder gar kein Effekt auf Uterus und Mamma, sowie eine effektive agonistische Wirkung in Bezug auf akute und langfristige negative Folgen der Menopause (87). Die vorliegenden Untersuchungen sollten einen Beitrag dazu leisten, Testsubstanzen, die im Arznei- und Nahrungsergänzungsbe- reich zur Anwendung kommen, im Hinblick auf diese Anforderungen zu validieren, wobei sich die Untersuchungen in dieser Arbeit auf die Zielorgane Gebärmutter und Gefäßsystem konzentrierte.

iCR kommt einerseits dieser Vorstellung eines idealen Phyto-SERMs recht nahe. Weder in der langjährigen Anwendung zur Behandlung perimenopausaler Beschwerden noch im Rahmen dieser Untersuchungen konnten potentiell adverse Wirkungen auf den Uterus festgestellt werden. Andererseits ist der genaue Wirkmechanismus auf die Zielprozesse bisher nicht geklärt. Es scheint immer plausibler, daß die wohl vorhandenen Wirkungen, die zu einer allgemeinen Verbesserung des Wohlbefindens betroffener Frauen führen, in Gänze nicht über das östrogene System vermittelt werden.

Bei 8PN scheint es sich unter Berücksichtigung aller im Rahmen dieser Arbeit gewonne- nen Ergebnisse, als auch weiterer Untersuchungen unserer sowie anderer Arbeitsgruppen, um eine rein östrogen wirkende Substanz zu handeln. Weiterhin konnte die für Phytoöstro- gene ungewöhnlich starke östrogene Wirkung sowohl auf den Uterus als auch auf das Ge- fäßsystem bestätigt werden. Generell stimmt nicht nur die Richtung, sondern auch der zeitliche Verlauf der Regulation der Genexpression E2-regulierter Gene sowohl im Uterus, wie auch in der Vena cava weitestgehend mit dem nach Behandlung mit E2 beobachteten Verlauf überein. Unter Berücksichtigung aller bislang gewonnenen Daten ist 8PN zwar als besonders stark wirkendes, wahrscheinlich ER α -selektives Phytoöstrogen von hohem Interesse, bei einem Einsatz für die postmenopausale Hormonersatztherapie sind aber aus meiner Sicht und nach derzeitigem Wissensstand keine Vorteile gegenüber dem Einsatz von E2, bzw. Ethinylöstradiol zu erkennen.

Dagegen machen die im Uterus sowie in der Vena cava gewonnenen Ergebnisse 6DMAN zu einem sehr interessanten Kandidaten-Molekül für die HRT. Genau wie 8PN scheint 6DMAN zwar eine E2-agonistische Wirkung auf die Expression einiger Gene im Uterus zu besitzen, eine uterotrophe Wirkung konnte jedoch ebenso wenig festgestellt werden, wie eine erhöhte Expression der Uterotrophie-assoziierten Gene KI67 und PCNA oder von VEGF oder VEGFR2, deren Expression bei der Vaskularisierung des Uterusepithels hochreguliert wird.

Das Gefäßsystem ist durch den während der Menopause abfallenden Östrogenspiegel besonders betroffen, da E2 eine protektive Wirkung auf das Gefäßsystem besitzt (siehe Abschnitt 1.8 auf Seite 13). Andererseits weist E2 eine angiogene Wirkung auf, die zur Vaskularisierung von Tumoren beiträgt (siehe gleicher Abschnitt).

Die mit 6DMAN durchgeführten Versuche legen nahe, daß auch diese Substanz eine östrogene Wirkung bezüglich der Expression einiger funktionell wichtiger Gene im Gefäß- system besitzt. Es könnte daher protektiv auf die Gefäße wirken. Weiterhin konnte keine angiogene Wirkung von 6DMAN gezeigt werden. Der HUVEC-basierte Proliferationstest war ebenso negativ, wie die Expression der Proliferations- und Angiogenese-assoziierten Gene PCNA, KI67, VEGF und VEGFR2. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Sicherheit

bezüglich der Förderung des Tumorwachstums bedeutsam, bei dem die Vaskularisierung ein wichtiger Teilaspekt ist. Demgegenüber zeigte E2 eine proliferationsfördernde Wirkung auf HUVECs und eine kurzzeitig verstärkte VEGFR2-Expression in der Vena cava und die bereits angesprochene Hochregulation der Expression von VEGF und VEGFR2 in den Gefäßen des Uterus, welche nach 6DMAN-Behandlung ebenfalls nicht beobachtet werden konnte.

Hier scheint 6DMAN also einen deutlichen Vorteil gegenüber E2 zu besitzen. Die eventuell vorhandene leicht differenzierungsfördernde Wirkung von 6DMAN auf venöse Endothelzellen machen jedoch weitere Untersuchungen bezüglich der Wirkung und Sicherheit von 6DMAN notwendig.

Die meisten Erkenntnisse über die östrogene Wirkung von 7OPN wurden im Rahmen dieser Arbeit gewonnen. Sie zeigen, daß auch dieses Molekül an den ER α bindet und dort eine, abhängig von der eingesetzten Konzentration, E2-agonistische oder -antagonistische Wirkung verursacht. Die Wirkung *in vivo* ist offenbar stark abhängig vom untersuchten Endpunkt. Es zeichnet sich aber ab, daß auch diese Substanz nicht uterotroph ist, was sie ebenfalls zu einem interessanten Kandidaten für die HRT macht. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der SERM-Eigenschaften erscheinen auch hier sinnvoll.

Die Ergebnisse verdeutlichen auch die Variabilität der ER-vermittelten Antworten, die durch die verschiedenen z.T. sehr ähnlichen Liganden ausgelöst werden. Die Naringenine sind ein herausragendes Beispiel für die Abhängigkeit der Wirkung auf das östrogene System von Veränderungen der funktionellen Gruppen bei gleichem Grundgerüst. So stellt das Naringenin selber eine kaum östrogen wirkende Substanz dar. Durch die Prenylierung in Position 8 dagegen erhält man das stärkste bisher bekannte Phytoöstrogen überhaupt. Scheinbar bewirkt die Umlagerung dieser Gruppe an andere Positionen wiederum den vollständigen Verlust der Östrogenität (111). Die Addition einer Dimethylallylgruppe in Position 6 hingegen führt, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu einer Verbindung, die man als Phyto-SERM bezeichnen kann. Auch die 7-Prenyloxy-Gruppe scheint zu wiederum anderen Wirkungen auf das östrogene System zu führen. Dieses breite Wirkspektrum der Naringenine in Bezug auf Östrogenrezeptor-vermittelte Signalwege und die Möglichkeit der chemischen Synthese von Naringeninderivaten, lassen es als sinnvoll erscheinen, die bereits bekannten Vertreter dieser Substanzklasse sowie auch weitere Naringenine weiter auf ihre Wirkung auf das Hormonsystem zu untersuchen und die genauen Wirkmechanismen aufzudecken.

Diese Arbeit hat dafür einige Ansatzpunkte geliefert. Interessant erscheinen mir z.B. die für die Wirkung von iCR auf das Gefäßsystem in der Leber gewonnenen Daten. Diese Untersuchungen sollten unbedingt auf die Naringenine ausgeweitet werden, da der Lipidmetabolismus eine weitere wichtige Komponente für die Aufrechterhaltung der Gefäßfunktionen darstellt. Zusätzlich zu den bereits etablierten Quantifizierungen der Expression von ApoA1 und Cyp7A1 bietet sich hier außerdem die Untersuchung des Expressionsmusters des LDL-Rezeptors an, der ebenfalls E2-abhängig exprimiert wird und ein entscheidender Faktor bei der Regulation des Blutspiegels von Cholesterin ist(66).

Auch die vielfältigen Interaktionen zwischen ER und AhR-Sytem werfen im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit vorgestellten Genexpressions-Daten des AhR und AhR-regulierter Gene weitere interessante Fragen, nicht nur zur Wirkung der Naringenine sondern auch zu Grundsätzlichen Wirkungen von Östrogenen auf AhR-regulierte Gene auf. Hier sticht insbesondere die starke Stimulation der Expression von GSTA2 im Uterus nach

Behandlung mit E2 und 8PN ins Auge (Abb. 3.11, S. 66).

Die Tatsache, daß 6DMAN SERM-Eigenschaften zeigt und insbesondere die Beobachtung, daß vor allem Gene, welche ein ERE besitzen, im Uterus der Ratten durch 6DMAN in ihrer Expression reguliert werden, andere E2-regulierte Gene jedoch in ihrer Expression durch 6DMAN nicht beeinflußt werden, läßt es weiterhin interessant erscheinen, Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Naringenine durchzuführen. Insbesondere RNA-Interference und Chromatin-Immunopräzipitation erscheinen mir hier als geeignete Methoden zur Identifizierung der beteiligten Faktoren.

Wichtig für die genauere Einschätzung der Wirksamkeit von Phyto-SERMs ist jedoch neben den Untersuchungen an Uterus und Gefäßsystem auch die Aufklärung der Wirkung auf weitere Zielorgane, wie den Knochen und das zentrale Nervensystem, da der Verlust von Knochenmasse, sowie Depressionen und Hitzewallungen zu den typischen Begleiterscheinungen der Menopause zählen.

Literaturverzeichnis

- [1] L. Mosca *et al.* Cardiovascular disease in women: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Writing Group. *Circulation*, 96(7): 2468 – 2482, 1997.
- [2] J. M. Sullivan und L. P. Fowlkes. The clinical aspects of estrogen and the cardiovascular system. *Obstet Gynecol*, 87(2 Suppl): 36S – 43S, 1996.
- [3] E. Barrett-Connor und T. L. Bush. Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA*, 265(14): 1861 – 1867, 1991.
- [4] D. Grady *et al.* Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*, 117(12): 1016 – 1037, 1992.
- [5] J. C. Stevenson *et al.* Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. Nonlipid effects. *Drugs*, 47 Suppl 2: 35 – 41, 1994.
- [6] M. J. Stampfer und G. A. Colditz. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev Med*, 20(1): 47 – 63, 1991.
- [7] B. M. Psaty *et al.* The risk of myocardial infarction associated with the combined use of estrogens and progestins in postmenopausal women. *Arch Intern Med*, 154(12): 1333 – 1339, 1994.
- [8] F. Grodstein *et al.* Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med*, 335(7): 453 – 461, 1996.
- [9] S. Hulley *et al.* Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA*, 280(7): 605 – 613, 1998.
- [10] D. Grady *et al.* Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, 288(1): 49 – 57, 2002.
- [11] J. E. Rossouw *et al.* Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3): 321 – 333, 2002.
- [12] S. R. Milligan *et al.* Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84(6): 2249 – 2252, 1999.

- [13] J. Tekel' *et al.* Determination of the hop-derived phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, in beer by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.*, 47(12): 5059 – 5063, 1999.
- [14] S. Gester *et al.* An efficient synthesis of the potent phytoestrogens 8-prenylnaringenin and 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin by europium(III)-catalyzed Claisen rearrangement. *Tetrahedron*, 69: 1015 – 1018, 2001.
- [15] S. V. Tokalov *et al.* Toxicity and cell cycle effects of synthetic 8-prenylnaringenin and derivatives in human cells. *Pharmacology*, 71(1): 46 – 56, 2004.
- [16] S. W. S. Nussey. *Endocrinology: An integrated approach*. Taylor & Francis, London, 2001.
- [17] V. Laudet *et al.* Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J*, 11(3): 1003 – 1013, 1992.
- [18] M. Beato, M. Truss und S. Chavez. Control of transcription by steroid hormones.. *Ann N Y Acad Sci.*, 784: 93–123, 1996.
- [19] K. Sak und H. Everaus. Nongenomic effects of 17beta-estradiol–diversity of membrane binding sites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 88(4-5): 323 – 335, 2004.
- [20] P. Walter *et al.* Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(23): 7889 – 7893, 1985.
- [21] G. L. Greene *et al.* Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231(4742): 1150 – 1154, 1986.
- [22] L. P. Menasce *et al.* Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*, 17(1): 263 – 265, 1993.
- [23] G. G. J. M. Kuiper *et al.* Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(12): 5925 – 5930, 1996.
- [24] S. Mosselman, J. Polman und R. Dijkema. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.*, 392(1): 49 – 53, 1996.
- [25] E. Enmark *et al.* Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(12): 4258 – 4265, 1997.
- [26] S. Nilsson *et al.* Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81(4): 1535 – 1565, 2001.
- [27] K. Pettersson und J. A. Gustafsson. Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol*, 63: 165 – 192, 2001.
- [28] H. Dotzlaw *et al.* Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(7): 2371 – 2374, 1997.

-
- [29] Y. Onoe *et al.* Expression of estrogen receptor beta in rat bone. *Endocrinology*, 138(10): 4509 – 4512, 1997.
- [30] M. Byers *et al.* Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol*, 11(2): 172 – 182, 1997.
- [31] J. Arts *et al.* Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, 138(11): 5067 – 5070, 1997.
- [32] A. W. Brandenberger *et al.* Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 82(10): 3509 – 3512, 1997.
- [33] M. L. Campbell-Thompson. Estrogen receptor alpha and beta expression in upper gastrointestinal tract with regulation of trefoil factor family 2 mRNA levels in ovariectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240(2): 478 – 483, 1997.
- [34] P. J. Shughrue, B. Komm und I. Merchenthaler. The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus. *Steroids*, 61(12): 678 – 681, 1996.
- [35] A. M. Brzozowski *et al.* Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389(6652): 753 – 758, 1997.
- [36] A. C. Pike *et al.* Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J*, 18(17): 4608 – 4618, 1999.
- [37] A. C. Pike *et al.* Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Biochem. Soc. Trans.*, 28(4): 396 – 400, 2000.
- [38] J. W. Lee *et al.* Transcriptional coregulators of the nuclear receptor superfamily: coactivators and corepressors. *Cell Mol Life Sci*, 58(2): 289 – 297, 2001.
- [39] C. L. Smith, Z. Nawaz und B. W. O'Malley. Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Mol Endocrinol*, 11(6): 657 – 666, 1997.
- [40] W. Rosner. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 20(4): 697 – 720, 1991.
- [41] T. M. Devlin (Herausgeber). *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, Inc., New York, USA, 1997.
- [42] C. M. Klinge *et al.* hsp70 is not required for high affinity binding of purified calf uterine estrogen receptor to estrogen response element DNA in vitro. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 63(4-6): 283 – 301, 1997.
- [43] L. Klein-Hitpass *et al.* An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell*, 46(7): 1053 – 1061, 1986.

- [44] K. Pettersson *et al.* Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 11(10): 1486 – 1496, 1997.
- [45] C. Teyssier *et al.* Characterization of the physical interaction between estrogen receptor alpha and JUN proteins. *J. Biol. Chem.*, 276(39): 36361 – 36369, 2001.
- [46] L. N. Petz *et al.* Estrogen receptor alpha and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 143(12): 4583 – 4591, 2002.
- [47] M. P. Gaub *et al.* Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. *Cell*, 63(6): 1267 – 1276, 1990.
- [48] A. Weisz und R. Rosales. Identification of an estrogen response element upstream of the human c-fos gene that binds the estrogen receptor and the AP-1 transcription factor. *Nucleic Acids Res*, 18(17): 5097 – 5106, 1990.
- [49] P. Webb *et al.* Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Mol Endocrinol*, 9(4): 443 – 456, 1995.
- [50] Y. Umayahara *et al.* Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J. Biol. Chem.*, 269(23): 16433 – 16442, 1994.
- [51] D. Dubik und R. P. Shiu. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene*, 7(8): 1587 – 1594, 1992.
- [52] X. S. Wu-Peng *et al.* Delineation of sites mediating estrogen regulation of the rat creatine kinase B gene. *Mol Endocrinol*, 6(2): 231 – 240, 1992.
- [53] V. Krishnan, X. Wang und S. Safe. Estrogen receptor-Sp1 complexes mediate estrogen-induced cathepsin D gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 269(22): 15912 – 15917, 1994.
- [54] A. K. Rishi *et al.* Estradiol regulation of the human retinoic acid receptor alpha gene in human breast carcinoma cells is mediated via an imperfect half-palindromic estrogen response element and Sp1 motifs. *Cancer Res*, 55(21): 4999 – 5006, 1995.
- [55] W. Porter *et al.* Role of estrogen receptor/Sp1 complexes in estrogen-induced heat shock protein 27 gene expression. *Mol Endocrinol*, 10(11): 1371 – 1378, 1996.
- [56] J. R. Schultz, L. N. Petz und A. M. Nardulli. Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.*, 280(1): 347 – 354, 2005.
- [57] A. Ray *et al.* Regulation of interleukin-6 gene expression by steroids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 762: 79 – 87 – discussion – 87 – 8, 1995.

-
- [58] K. Yamamoto *et al.* Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumor necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.*, 270(52): 31315 – 31320, 1995.
- [59] D. Elewaut *et al.* NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol*, 163(3): 1457 – 1466, 1999.
- [60] W. E. t. Ackerman *et al.* Modulation of cytokine-induced cyclooxygenase 2 expression by PPARG ligands through NFkappaB signal disruption in human WISH and amnion cells. *Biol Reprod*, 73(3): 527 – 535, 2005.
- [61] M. H. Wyckoff *et al.* Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through Galpha(i). *J. Biol. Chem.*, 276(29): 27071 – 27076, 2001.
- [62] W. Owens und H. B. W. M. Koeter. The OECD program to validate the rat uterotropic bioassay: an overview. *Environ. Health Perspect.*, 111(12): 1527 – 1529, 2003.
- [63] M. D. Mueller *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(20): 10972 – 10977, 2000.
- [64] T. Matsumoto und L. Claesson-Welsh. VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE*, 2001(112): RE21, 2001.
- [65] J.-F. Arnal und F. Bayard. Alteration in endothelial estrogen receptor expression: a potential key of vasculoprotection by estrogens? *Circ Res*, 91(9): 759 – 760, 2002.
- [66] P. Parini *et al.* Biphasic effects of the natural estrogen 17beta-estradiol on hepatic cholesterol metabolism in intact female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20(7): 1817 – 1823, 2000.
- [67] D. Grady *et al.* Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med*, 132(9): 689 – 696, 2000.
- [68] S. Hulley *et al.* Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA*, 288(1): 58 – 66, 2002.
- [69] A. Johns *et al.* Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology*, 137(10): 4511 – 4513, 1996.
- [70] A. Gagliardi und D. C. Collins. Inhibition of angiogenesis by antiestrogens. *Cancer Res*, 53(3): 533 – 535, 1993.
- [71] J. K. Findlay. Angiogenesis in reproductive tissues. *J. Endocrinol.*, 111(3): 357 – 366, 1986.

- [72] J. A. Simon *et al.* Polysiloxane vaginal rings and cylinders for physiologic endometrial priming in functionally agonadal women. *Fertil Steril*, 46(4): 619 – 625, 1986.
- [73] M. V. Sauer *et al.* Scanning electron microscopy of the endometrium in functionally agonadal women receiving steroid replacement therapy with polysiloxane vaginal rings and cylinders. *J Reprod Med*, 32(9): 688 – 692, 1987.
- [74] R. R. Weichselbaum *et al.* Proliferation kinetics of a human breast cancer line in vitro following treatment with 17beta-estradiol and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*, 38(8): 2339 – 2342, 1978.
- [75] R. A. Huseby, T. M. Maloney und C. M. McGrath. Evidence for a direct growth-stimulating effect of estradiol on human MCF-7 cells in vivo. *Cancer Res*, 44(6): 2654 – 2659, 1984.
- [76] E. F. Haran *et al.* Tamoxifen enhances cell death in implanted MCF7 breast cancer by inhibiting endothelium growth. *Cancer Res*, 54(21): 5511 – 5514, 1994.
- [77] E. C. Dodds und W. Lawson. Synthetic, oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature*, 137, 1936.
- [78] P. Perez *et al.* The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.*, 106(3): 167 – 174, 1998.
- [79] S. Pawlowski *et al.* Temperature-dependent vitellogenin-mRNA expression in primary cultures of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes at 14 and 18 degrees C. *Toxicol In Vitro*, 14(6): 531 – 540, 2000.
- [80] E. J. Routledge und J. P. Sumpter. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15(3): 241 – 248, 1996.
- [81] J. Bitman *et al.* Estrogenic activity of o,p'-DDT in the mammalian uterus and avian oviduct. *Science*, 162(851): 371 – 372, 1968.
- [82] J. F. R. Robertson. Selective oestrogen receptor modulators/new antioestrogens: a clinical perspective. *Cancer Treat Rev*, 30(8): 695 – 706, 2004.
- [83] A. Howell *et al.* ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, pure antiestrogen. *Cancer*, 89(4): 817 – 825, 2000.
- [84] A. E. Wakeling. Similarities and distinctions in the mode of action of different classes of antioestrogens. *Endocr Relat Cancer*, 7(1): 17 – 28, 2000.
- [85] J. F. Robertson. Faslodex (ICI 182, 780), a novel estrogen receptor downregulator—future possibilities in breast cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 79(1-5): 209 – 212, 2001.
- [86] P. Cos *et al.* Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med.*, 69(7): 589 – 599, 2003.

-
- [87] G. Vollmer und O. Zierau. Was sind Phytoestrogene und Phyto-SERMs? *Pharm Unserer Zeit*, 33(5): 378 – 383, 2004.
- [88] A. L. Huntley und E. Ernst. A systematic review of herbal medicinal products for the treatment of menopausal symptoms. *Menopause*, 10(5): 465 – 476, 2003.
- [89] J. Wylie-Rosett. Menopause, micronutrients, and hormone therapy. *Am J Clin Nutr*, 81(5): 1223S – 1231S, 2005.
- [90] P. Carmeliet und R. K. Jain. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801): 249 – 257, 2000.
- [91] K. S. Moulton *et al.* Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100(8): 4736 – 4741, 2003.
- [92] E. M. Paleolog. Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 4 Suppl 3: S81 – 90, 2002.
- [93] S. Foster. Black cohosh: *Cimicifuga racemosa* a literature review. *HerbalGram*, 45: 37 – 49, 1999.
- [94] M. Pahlow. *Das große Buch der Heilpflanzen*. Gräfe und Unzer Verlag, München, 2. Auflage, 1987.
- [95] W. Hand. *The House Surgeon and Physician*. Peter B. Cleason & Co., Hartford, Connecticut, USA, 1818.
- [96] H. Stolze. An alternative to treat menopausal complaints. *Gynecology*, 3: 14–16, 1982.
- [97] H. Jarry, G. Harnischfeger und E. Duker. [The endocrine effects of constituents of *Cimicifuga racemosa*. 2. In vitro binding of constituents to estrogen receptors]. *Planta Med.*, (4): 316 – 319, 1985.
- [98] E. Liske. Therapeutic efficacy and safety of *Cimicifuga racemosa* for gynecologic disorders. *Adv Ther*, 15(1): 45 – 53, 1998.
- [99] C. Bodinet und J. Freudenstein. Influence of *Cimicifuga racemosa* on the proliferation of estrogen receptor-positive human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 76(1): 1 – 10, 2002.
- [100] O. Zierau *et al.* Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 80(1): 125 – 130, 2002.
- [101] S. O. Kruse *et al.* Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. *Planta Med.*, 65(8): 763 – 764, 1999.
- [102] S. Stromeier, F. Petereit und A. Nahrstedt. Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7 cells. *Planta Med.*, 71(6): 495 – 500, 2005.

- [103] T. Nisslein und J. Freudenstein. Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab*, 21(6): 370 – 376, 2003.
- [104] V. Viereck *et al.* Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J Bone Miner Res*, 20(11): 2036 – 2043, 2005. doi:10.1359/JBMR.050716.
- [105] J. E. Burdette *et al.* Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J. Agric. Food. Chem.*, 51(19): 5661 – 5670, 2003.
- [106] P. W. Whiting, A. Clouston und P. Kerlin. Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Med J Aust*, 177(8): 440 – 443, 2002.
- [107] S. Lontos *et al.* Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust*, 179(7): 390 – 391, 2003.
- [108] M. Thomsen und M. Schmidt. Hepatotoxicity from *Cimicifuga racemosa*? Recent Australian case report not sufficiently substantiated. *J Altern Complement Med*, 9(3): 337 – 340, 2003.
- [109] M. Thomsen *et al.* Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust*, 180(11): 598 – 9 – author – reply – 599 – 600, 2004.
- [110] O. Zierau *et al.* Estrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.*, 68(5): 449 – 451, 2002.
- [111] M. Kitaoka *et al.* Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med.*, 64(6): 511 – 515, 1998.
- [112] O. Zierau *et al.* Antiandrogenic activity of the phytoestrogens naringenin, 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin and 8-prenylnaringenin. *Planta Med.*, 69(9): 856 – 858, 2003.
- [113] E. K. Seo *et al.* Cytotoxic prenylated flavanones from *Monotes engleri*. *Phytochemistry*, 45(3): 509 – 515, 1997.
- [114] O. Zierau *et al.* Uterine effects of the phytoestrogen 6-(1,1-dimethylallyl)naringenin in rats. *Planta Med.*, 70(7): 590 – 593, 2004.
- [115] M. Miyamoto *et al.* Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylnaringenin on bone metabolism. *Planta Med.*, 64(6): 516 – 519, 1998.
- [116] S. Milligan *et al.* Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*, 123(2): 235 – 242, 2002.

-
- [117] S. R. Milligan *et al.* The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85(12): 4912 – 4915, 2000.
- [118] P. Diel *et al.* Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. *Planta Med.*, 70(1): 39 – 44, 2004.
- [119] O. Schaefer *et al.* 8-Prenyl naringenin is a potent ERalpha selective phytoestrogen present in hops and beer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 84(2-3): 359 – 360, 2003.
- [120] J. A. Cidlowski und T. G. Muldoon. Sex-related differences in the regulation of cytoplasmic estrogen receptor levels in responsive tissues of the rat. *Endocrinology*, 98(4): 833 – 841, 1976.
- [121] J. J. Pinzone *et al.* Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol*, 24(11): 4605 – 4612, 2004. doi:10.1128/MCB.24.11.4605-4612.2004.
- [122] S. Bhakdi. An hypothesis for the immunopathogenesis of atherosclerosis. *Clin Nephrol*, 60 Suppl 1: S49 – 52, 2003.
- [123] S. Bhakdi *et al.* Beyond cholesterol: the enigma of atherosclerosis revisited. *Thromb Haemost*, 91(4): 639 – 645, 2004.
- [124] W. Schmiedt *et al.* Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18(11): 1790 – 1795, 1998.
- [125] P. Diel *et al.* Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 73(1-2): 1 – 10, 2000.
- [126] S. A. Sundstrom *et al.* Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J. Biol. Chem.*, 264(28): 16941 – 16947, 1989.
- [127] O. Blaschuk, K. Burdzy und I. B. Fritz. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J. Biol. Chem.*, 258(12): 7714 – 7720, 1983.
- [128] I. B. Fritz *et al.* Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biol Reprod*, 28(5): 1173 – 1188, 1983.
- [129] M. D. Griswold, C. Morales und S. R. Sylvester. Molecular biology of the Sertoli cell. *Oxf Rev Reprod Biol*, 10: 124 – 161, 1988.
- [130] S. R. Sylvester *et al.* Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biol Reprod*, 45(1): 195 – 207, 1991.
- [131] B. J. Aronow *et al.* Apolipoprotein J Expression at Fluid-Tissue Interfaces: Potential Role in Barrier Cytoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90(2): 725 – 729, 1993.

- [132] D. E. Jenne und J. Tschopp. Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *Trends Biochem. Sci.*, 17(4): 154 – 159, 1992.
- [133] M. Miyata *et al.* Apolipoprotein J/clusterin is induced in vascular smooth muscle cells after vascular injury. *Circulation*, 104(12): 1407 – 1412, 2001.
- [134] H. V. de Silva *et al.* A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, 265(22): 13240 – 13247, 1990.
- [135] D. E. Jenne und J. Tschopp. Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma: identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(18): 7123 – 7127, 1989.
- [136] R. Buttyan *et al.* Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol*, 9(8): 3473 – 3481, 1989.
- [137] J. G. Leger, M. L. Montpetit und M. P. Tenniswood. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 147(1): 196 – 203, 1987.
- [138] M. Danik *et al.* Human Gliomas and Epileptic Foci Express High Levels of a mRNA Related to Rat Testicular Sulfated Glycoprotein 2, a Purported Marker of Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(19): 8577 – 8581, 1991.
- [139] P. C. May *et al.* Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*, 5(6): 831 – 839, 1990.
- [140] J. R. Duguid *et al.* Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(18): 7260 – 7264, 1989.
- [141] A. M. Lidstrom *et al.* Clusterin (apolipoprotein J) protein levels are increased in hippocampus and in frontal cortex in Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 154(2): 511 – 521, 1998.
- [142] M. Freixes *et al.* Clusterin solubility and aggregation in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)*, 108(4): 295 – 301, 2004.
- [143] A. B. J. Clusterin(ApoJ) and ApoE in normal and pathological tissue.
- [144] D. T. Humphreys *et al.* Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, 274(11): 6875 – 6881, 1999.
- [145] P. Wong *et al.* Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 268(7): 5021 – 5031, 1993.
- [146] N. Rosemblyt und C. L. Chen. Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements. *J Mol Endocrinol*, 13(1): 69 – 76, 1994.

-
- [147] W. Wunsche *et al.* Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue. *Int J Cancer*, 76(5): 684 – 688, 1998.
- [148] T. L. Brown *et al.* Expression of apolipoprotein J in the uterus is associated with tissue remodeling. *Biol Reprod*, 52(5): 1038 – 1049, 1995.
- [149] O. M. Conneely *et al.* Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig*, 7(1 Suppl): S25 – 32, 2000.
- [150] J. D. Graham und C. L. Clarke. Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res*, 4(5): 187 – 190, 2002.
- [151] A. M. Nardulli *et al.* Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology*, 122(3): 935 – 944, 1988.
- [152] W. L. Kraus und B. S. Katzenellenbogen. Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*, 132(6): 2371 – 2379, 1993.
- [153] T. Hla und K. Neilson. Human Cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(16): 7384 – 7388, 1992.
- [154] R. Tazawa *et al.* Characterization of the genomic structure, chromosomal location and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203(1): 190 – 199, 1994.
- [155] J. R. Vane. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231(25): 232 – 235, 1971.
- [156] C. E. Eberhart und R. N. Dubois. Eicosanoids and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 109(1): 285 – 301, 1995.
- [157] A. C. Calkin *et al.* Rapid potentiation of endothelium-dependent vasodilation by estradiol in postmenopausal women is mediated via cyclooxygenase 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(11): 5072 – 5075, 2002.
- [158] T. Kuwano *et al.* Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J*, 18(2): 300 – 310, 2004.
- [159] K. Brune und B. Hinz. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol*, 33(1): 1 – 6, 2004.
- [160] G. Charpigny *et al.* Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, 138(5): 2163 – 2171, 1997.

- [161] W. Y. Wong und J. S. Richards. Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin H synthase in the rat ovary. *Mol Endocrinol*, 5(9): 1269 – 1279, 1991.
- [162] J. Sirois und J. S. Richards. Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J. Biol. Chem.*, 267(9): 6382 – 6388, 1992.
- [163] J. Sirois. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology*, 135(3): 841 – 848, 1994.
- [164] T. Hertrampf *et al.* Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. *Mol Cell Endocrinol*, 243(1-2): 51 – 57, 2005.
- [165] C. W. Xiao *et al.* Regulation of cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase gene expression by steroid hormones and interferon-tau in bovine endometrial cells. *Endocrinology*, 139(5): 2293 – 2299, 1998.
- [166] P. Akarasereenont *et al.* The induction of cyclooxygenase-2 by 17beta-estradiol in endothelial cells is mediated through protein kinase C. *Inflamm Res*, 49(9): 460 – 465, 2000.
- [167] J. A. Ospina, S. P. Duckles und D. N. Krause. 17beta-estradiol decreases vascular tone in cerebral arteries by shifting COX-dependent vasoconstriction to vasodilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285(1): H241 – 50, 2003.
- [168] W. K. Alderton, C. E. Cooper und R. G. Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J*, 357(Pt 3): 593 – 615, 2001.
- [169] R. M. Palmer, A. G. Ferrige und S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327(6122): 524 – 526, 1987.
- [170] S. P. Janssens *et al.* Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 267(21): 14519 – 14522, 1992.
- [171] U. Forstermann, J. P. Boissel und H. Kleinert. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*, 12(10): 773 – 790, 1998.
- [172] D. W. Leung *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935): 1306 – 1309, 1989.
- [173] Z. Poltorak *et al.* VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, 272(11): 7151 – 7158, 1997.

-
- [174] J. Folkman. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*, 1(1): 27 – 31, 1995.
- [175] R. N. Taylor *et al.* Endocrine and paracrine regulation of endometrial angiogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 943: 109 – 121, 2001.
- [176] S. K. Banerjee *et al.* Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis*, 18(6): 1155 – 1161, 1997.
- [177] S. Garvin, U. W. Nilsson und C. Dabrosin. Effects of oestradiol and tamoxifen on VEGF, soluble VEGFR-1, and VEGFR-2 in breast cancer and endothelial cells. *Br J Cancer*, 93(9): 1005 – 1010, 2005.
- [178] C. E. Gargett *et al.* 17Beta-estradiol up-regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in human myometrial microvascular endothelial cells: role of estrogen receptor-alpha and -beta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87(9): 4341 – 4349, 2002.
- [179] E. Villard und F. Soubrier. Molecular biology and genetics of the angiotensin-I-converting enzyme: potential implications in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*, 32(6): 999 – 1007, 1996.
- [180] T. W. Kurtz. Myocardial infarction. The ACE of hearts. *Nature*, 359(6396): 588 – 589, 1992.
- [181] P. E. Gallagher *et al.* Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*, 33(1 Pt 2): 323 – 328, 1999.
- [182] T. Y. Goraya *et al.* Identification of positive and negative transcriptional regulatory elements of the rabbit angiotensin-converting enzyme gene. *Nucleic Acids Res*, 22(7): 1194 – 1201, 1994.
- [183] M.-G. Mattei *et al.* Angiotensin-I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet. Cell Genet.*, 51: 1041, 1989.
- [184] I. Suzuka *et al.* Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(9): 3189 – 3193, 1989.
- [185] Y. Maeshima *et al.* Antisense oligonucleotides to proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 inhibit human mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol*, 7(10): 2219 – 2229, 1996.
- [186] L. F. Ferreri und H. K. Naito. Stimulation of hepatic cholesterol 7alpha-hydroxylase activity by administration of an estrogen (17beta-estradiol-3-benzoate) to female rats. *Steroids*, 29(2): 229 – 235, 1977.

- [187] Y. Fujii-Kuriyama und J. Mimura. Molecular mechanisms of AhR functions in the regulation of cytochrome P450 genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 338(1): 311 – 317, 2005. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.162.
- [188] D. W. Nebert. The Ah locus: genetic differences in toxicity, cancer, mutation, and birth defects. *Crit. Rev. Toxicol.*, 20(3): 153 – 174, 1989.
- [189] D. W. Nebert. Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. *Biochem. Pharmacol.*, 47(1): 25 – 37, 1994.
- [190] D. W. Nebert und J. J. Duffy. How knockout mouse lines will be used to study the role of drug-metabolizing enzymes and their receptors during reproduction and development, and in environmental toxicity, cancer, and oxidative stress. *Biochem. Pharmacol.*, 53(3): 249 – 254, 1997.
- [191] D. W. Nebert, A. Puga und V. Vasiliou. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 685: 624 – 640, 1993.
- [192] M. Antenos, R. F. Casper und T. J. Brown. Interaction with Nedd8, a ubiquitin-like protein, enhances the transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, 277(46): 44028 – 44034, 2002.
- [193] M. H. Falahatpisheh und K. S. Ramos. Ligand-activated Ahr signaling leads to disruption of nephrogenesis and altered Wilms' tumor suppressor mRNA splicing. *Oncogene*, 22(14): 2160 – 2171, 2003.
- [194] P. M. Fernandez-Salguero *et al.* Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140(1): 173 – 179, 1996.
- [195] S. K. Kolluri *et al.* p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells. *Genes Dev*, 13(13): 1742 – 1753, 1999.
- [196] J. V. Schmidt *et al.* Characterization of a murine Ahr null allele: Involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(13): 6731 – 6736, 1996.
- [197] J. P. W. Jr. Induction of cytochrome P4501A1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 39: 103 – 125, 1999.
- [198] S. Safe, M. Wormke und I. Samudio. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(3): 295 – 306, 2000.
- [199] I. Kharat und F. Saatcioglu. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J. Biol. Chem.*, 271(18): 10533 – 10537, 1996.

- [200] M. Wormke *et al.* Estrogen and aryl hydrocarbon receptor expression and crosstalk in human Ishikawa endometrial cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 72(5): 197 – 207, 2000.
- [201] I. Chen *et al.* Identification of estrogen-induced genes downregulated by AhR agonists in MCF-7 breast cancer cells using suppression subtractive hybridization. *Gene*, 262(1-2): 207 – 214, 2001.
- [202] C. L. Chaffin, A. L. Trewin und R. J. Hutz. Estrous cycle-dependent changes in the expression of aromatic hydrocarbon receptor (AHR) and AHR-nuclear translocator (ARNT) mRNAs in the rat ovary and liver. *Chem. Biol. Interact.*, 124(3): 205 – 216, 2000.
- [203] C. L. Chaffin, R. L. Stouffer und D. M. Duffy. Gonadotropin and steroid regulation of steroid receptor and aryl hydrocarbon receptor messenger ribonucleic acid in macaque granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology*, 140(10): 4753 – 4760, 1999.
- [204] V. A. Tutel'yan *et al.* Flavonoids and resveratrol as regulators of Ah-receptor activity: protection from dioxin toxicity. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 136(6): 533 – 539, 2003.
- [205] D. R. Nelson *et al.* P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics*, 6(1): 1 – 42, 1996.
- [206] P. Honkakoski und M. Negishi. Regulation of cytochrome P450 (CYP) genes by nuclear receptors. *Biochem. J.*, 347(Pt 2): 321 – 337, 2000.
- [207] J. Corchero *et al.* Organization of the CYP1A cluster on human chromosome 15: implications for gene regulation. *Pharmacogenetics*, 11(1): 1 – 6, 2001.
- [208] T. R. Sutter *et al.* Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J. Biol. Chem.*, 269(18): 13092 – 13099, 1994.
- [209] Y. M. Tang *et al.* Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.*, 271(45): 28324 – 28330, 1996.
- [210] Y. Y. Wo, J. Stewart und W. F. Greenlee. Functional analysis of the promoter for the human CYP1B1 gene. *J. Biol. Chem.*, 272(42): 26702 – 26707, 1997.
- [211] C. L. Hayes *et al.* 17beta -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(18): 9776 – 9781, 1996.
- [212] J. G. Liehr und D. Roy. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med*, 8(4): 415 – 423, 1990.
- [213] I. Dwivedy *et al.* Synthesis and characterization of estrogen 2,3- and 3,4-quinones. Comparison of DNA adducts formed by the quinones versus horseradish peroxidase-activated catechol estrogens. *Chem. Res. Toxicol.*, 5(6): 828 – 833, 1992.

- [214] L. M. Nutter *et al.* An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.*, 7(1): 23 – 28, 1994.
- [215] Y. Tsuchiya *et al.* Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res*, 64(9): 3119 – 3125, 2004.
- [216] R. N. Armstrong. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*, 10(1): 2 – 18, 1997.
- [217] F. Morel *et al.* The human glutathione transferase alpha locus: genomic organization of the gene cluster and functional characterization of the genetic polymorphism in the hGSTA1 promoter. *Pharmacogenetics*, 12(4): 277 – 286, 2002.
- [218] T. Suzuki, S. Smith und P. G. Board. Structure and function of the 5' flanking sequences of the human alpha class glutathione S-transferase genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 200(3): 1665 – 1671, 1994.
- [219] K. H. Grzeschik. Assignment of a structural gene for a fourth human diaphorase (DIA4) to chromosome 16 in man-mouse somatic cell hybrids. *Hum Genet*, 53(2): 189 – 193, 1980.
- [220] S. Povey, D. Wilson und Y. H. Edwards. Assignment of a human diaphorase (DIA4) to chromosome 16. *Ann Hum Genet*, 43(4): 349 – 353, 1980.
- [221] L. Z. Chen *et al.* A refined physical map of the long arm of human chromosome 16. *Genomics*, 10(2): 308 – 312, 1991.
- [222] A. K. Jaiswal *et al.* Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J. Biol. Chem.*, 263(27): 13572 – 13578, 1988.
- [223] A. M. Benson, M. J. Hunkeler und P. Talalay. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(9): 5216 – 5220, 1980.
- [224] A. M. Soto *et al.* The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.*, 103 Suppl 7: 113 – 122, 1995.
- [225] H. K. Kleinman *et al.* Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21(24): 6188 – 6193, 1982.
- [226] H. K. Kleinman *et al.* Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry*, 25(2): 312 – 318, 1986.
- [227] Y. Kubota *et al.* Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.*, 107(4): 1589 – 1598, 1988.

-
- [228] R. J. MacDonald *et al.* Isolation of RNA using guanidinium salts. *Methods of Enzymology*, 152: 219 – 227, 1987.
- [229] T. M. J. Sambrook, E. F. Fritsch. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA, 2. Auflage, 1989.
- [230] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9): e45, 2001.
- [231] D. D. Wagner und V. J. Marder. Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells: processing steps and their intracellular localization. *J. Cell Biol.*, 99(6): 2123 – 2130, 1984.
- [232] D. E. Morales *et al.* Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation*, 91(3): 755 – 763, 1995.
- [233] T. K. Mukherjee *et al.* Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: Implications in atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(6): 4055 – 4060, 2002.
- [234] C. Lippert *et al.* Comparison of the effects of 17alpha-ethinylestradiol and 17beta-estradiol on the proliferation of human breast cancer cells and human umbilical vein endothelial cells. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 29(2): 87 – 90, 2002.
- [235] C. Keck *et al.* Effects of 17beta-estradiol and progesterone on interleukin-6 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 106(4): 334 – 339, 1998.
- [236] R. Osmers und K. Kraft. Phytotherapie bei Wechseljahresbeschwerden. *Pharm Unserer Zeit*, 33(5): 384 – 391, 2004. doi:10.1002/pauz.200400086.
- [237] B. Sherwin. Estrogen and cognitive aging in women. *Neuroscience.*, 138(3): 1021 – 1026, 2006.
- [238] J. Matthews *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol*, 25(13): 5317 – 5328, 2005.
- [239] C. Y. Chang und A. Puga. Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor. *Mol Cell Biol*, 18(1): 525 – 535, 1998.
- [240] C. M. Schaldach, R. J und B. LF. Lipoxin A4: a new class of ligand for the Ah receptor. *Biochemistry*, 38(23): 7594 – 7600, 1999.
- [241] D. Phelan *et al.* Activation of the Ah receptor signal transduction pathway by bilirubin and biliverdin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 357(1): 155 – 163, 1998. doi: 10.1006/abbi.1998.0814.
- [242] S. Heath-Pagliuso *et al.* Activation of the Ah receptor by tryptophan and tryptophan metabolites. *Biochemistry*, 37(33): 11508 – 11515, 1998.

- [243] I. M. Stefansson, H. B. Salvesen und L. A. Akslen. Vascular proliferation is important for clinical progress of endometrial cancer. *Cancer Res*, 66(6): 3303 – 3309, 2006.
- [244] C. Dabrosin, P. J. Margetts und J. Gauldie. Estradiol increases extracellular levels of vascular endothelial growth factor in vivo in murine mammary cancer. *Int J Cancer*, 107(4): 535 – 540, 2003.
- [245] Y. B. Kim *et al.* Vascular endothelial growth factor expression is not regulated by estradiol or medroxyprogesterone acetate in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 61(1): 97 – 100, 1996.
- [246] S. A. O’Toole *et al.* Oestrogen regulated gene expression in normal and malignant endometrial tissue. *Maturitas*, 51(2): 187 – 198, 2005.
- [247] A. Stavreus-Evers *et al.* Estrogenic influence on the regulation of hepatic estrogen receptor-alpha and serum level of angiotensinogen in female rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 78(1): 83 – 88, 2001.
- [248] Z. Weihua *et al.* Estrogen receptor (ER) beta , a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(11): 5936 – 5941, 2000.
- [249] J. Christoffel, G. Rimoldi und W. Wuttke. Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment. *J. Endocrinol.*, 188(3): 397 – 405, 2006. doi:10.1677/joe.1.06384.
- [250] M. S. Pepper *et al.* 8-prenylnaringenin, a novel phytoestrogen, inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.*, 199(1): 98 – 107, 2004. doi:10.1002/jcp.10460.
- [251] P. Webb *et al.* The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions. *Mol Endocrinol*, 13(10): 1672 – 1685, 1999.